SYNTHESE VON SEGMENTEN DES RINDERINSULINS AM IMMOBILISIERTEN POLYOXYETHYLEN UNTER VERWENDUNG EINES PHOTOLABILEN ANKERS

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Michael Dengler
aus München

~~1984~~
1983

UNIV.
LEIDEN
ARCH.

SYNTHESE VON SEGMENTEN DES RINDERINSULINS AM IMMOBILISIERTEN POLYOXYETHYLEN UNTER VERWENDUNG EINES PHOTOLABILEN ANKERS

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Michael Dengler
aus München

1984

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Dezember 1983

Dekan:	Prof. Dr. J. Strähle
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Bayer
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Voelter

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Ernst Bayer in der Zeit von Juni 1981 bis Juli 1983 am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen durchgeführt.

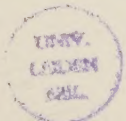
Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Ernst Bayer danke ich für die Stellung des Themas, seine großzügige Unterstützung und das rege Interesse an dieser Arbeit.

A B S T R A C T

DENGLER, MICHAEL

SYNTHESE VON SEGMENTEN DES RINDERINSULINS AM IMMOBILISIERTEN POLYOXYETHYLEN UNTER VERWENDUNG EINES PHOTOLABILEN ANKERS

Es werden Synthesen von Segmenten des Rinderinsulins an einem polymeren Träger beschrieben, der aus einer vernetzten Polystyrolmatrix und löslichen Polyoxyethylenketten besteht.
Die Darstellbarkeit des Polymers durch Veretherung von chlormethyliertem Polystyrol mit Polyoxyethylen der Molmasse 3000 wird untersucht. Die Eignung des Polymers als Träger für Peptidsynthesen in einem standardisierten Kupplungszyklus wird gezeigt.
Durch den Einsatz von BOC-Aminosäure-(4-carboxy-2-nitro)benzylestern wird eine quantitative Fixierung der C-terminalen Aminosäure und eines photolabilen Ankers am Polymer erreicht. Die Peptide werden durch Kupplung von Einzelbausteinen zum N-terminalen Ende hin aufgebaut. Die Solubilisierung des Peptids am polymeren Träger wird durch NMR-Untersuchungen belegt. Die Abspaltung vom Polymer erfolgt durch Photolyse.
So werden das geschützte C-terminale Tetra- und Dekapeptid der Rinderinsulin-B-Kette isoliert. Mit Fluorwasserstoff werden die Schutzgruppen von Drittfunktionen entfernt und die Peptide mittels Ionenaustauschchromatographie rein erhalten.
Es wird gezeigt, daß bei Kupplungen mit Arginin die gleichzeitige Verwendung der Mbs-Gruppe zum Schutz der Guanidinofunktion und der N^{α}-BOC-Gruppe zu nicht erwünschten Nebenreaktionen führt.
Die polymergebundene Rinderinsulin-B-Kette wird mit Ausnahme der Kupplung zum Dokosapeptid stufenweise aufgebaut. Insbesondere bei der Kupplung der letzten zehn Aminosäuren treten Schwierigkeiten auf. Die photolytische Abspaltung des Triakontapeptids läßt sich durchführen. Die Identifizierung der Insulin-B-Kette nach der Schutzgruppenabspaltung gelingt mit Hilfe der HPLC. Auf eine Isolierung des gereinigten Peptids wird wegen erheblichen Verunreinigungen verzichtet.



Für Viola

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543907_0045

INHALTSVERZEICHNIS

A.	ALLGEMEINER TEIL	1
1.	Einleitung	1
2.	Methoden der Peptidsynthese	2
2.1.	Grundprinzip der Peptidsynthese	2
2.2.	Schutzgruppen	2
2.3.	Kupplungsmethoden	3
2.4.	Strategie der Peptidsynthese	3
2.4.1.	Klassische Synthese	3
2.4.2.	Synthese am unlöslichen polymeren Träger	4
2.4.3.	Synthese am löslichen polymeren Träger	5
2.4.4.	Fest-Flüssigphasen-Technik	7
3.	Problemstellung	7
4.	Insulin	9
4.1.	Struktur und Funktion	9
4.2.	Insulinsynthesen	11
5.	Der polymere Träger PS-POE	12
5.1.	Allgemeines	12
5.2.	Untersuchungen zur Darstellung von immobilisiertem POE durch Veretherung von Polystyrol und Polyoxyethylen	13
5.3.	Stabilität des Polymers	17
5.4.	Verwendung als Träger in der Peptidsynthese	18
5.4.1.	Peptidaufbau	18
5.4.2.	Abspaltung eines Tetrapeptids unter photolytischen Bedingungen	20
5.5.	Diskussion	22

6.	Synthese von Peptidsequenzen der Rinder-insulin-B-Kette am PS-POE	24
6.1.	Vorbereitung des Polymers	24
6.2.	Schutzgruppenwahl	25
6.2.1.	Untersuchungen zur Mbs-Gruppe als Schutz der Guanidinofunktion des Arginins	26
6.3.	Synthesezyklus	28
6.4.	Beobachtungen zum Verlauf der Synthese	30
6.5.	NMR-spektroskopische Untersuchungen am Polymerpeptid	32
6.6.	Photolytische Abspaltung des C-terminalen Dekapeptids	36
6.6.1.	Aufarbeitung des Peptids	38
6.7.	Photolyse der Sequenz B_{1-30}	39
6.8.	Identifizierung der Rinderinsulin-B-Kette	41
6.9.	Diskussion	43
B.	EXPERIMENTELLER TEIL	47
1.	Allgemeines	47
1.1.	Verzeichnis der Abkürzungen	47
1.2.	Geräte und Instrumente	48
1.3.	Lösungsmittel und Chemikalien	49
1.4.	Nachweisreagentien	50
1.5.	Allgemeine Arbeitsvorschriften	52
1.5.1.	Aminosäureanalyse	52
1.5.2.	Razemisierungstest	52
1.5.3.	Aktivierung der Aminosäurederivate	53
1.5.4.	Veresterung von PS-POE mit BOC-Glycin	53
1.5.5.	Photolyse	53
1.5.6.	Schutzgruppenabspaltung mit HF	54
1.5.7.	HPLC	54

2.	Darstellung der Ausgangsverbindungen	55
2.1.	Darstellung der Aminosäurederivate	55
2.2.	BOC-Glu(Bzl)-Arg(Mbs)-OH	55
2.3.	Veretherung von Polystyrol mit Polyoxyethylen	57
2.3.1.	Testkupplungen am polymeren Träger	58
3.	Photolytische Abspaltung des Peptids B_{27-30} vom Träger PS-POE_{3000}	59
3.1.	Aufarbeitung des geschützten Peptids	59
3.2.	Schutzgruppenabspaltung mit HF und Reinigung des Tetrapeptids	61
4.	Synthese der Sequenz B_{1-30} des Rinderinsulins am immobilisierten Polyoxyethylen	63
5.	Kupplungen mit N^{ω}-Methoxybenzolsulfonyl-argininderivaten	69
5.1.	Klassische Kupplungen	69
5.1.1.	Reaktion von Z-Arg(Mbs)-OH mit Gly-OMe	69
5.1.2.	Reaktion von BOC-Arg(Mbs)-OH mit Gly-OMe	70
5.2.	Testkupplungen von N^{ω}-Mbs-Argininderivaten am polymeren Träger	73
6.	Photolytische Abspaltung von Peptiden am immobilisierten Polyoxyethylen	73
6.1.	Isolierung des C-terminalen Dekapeptids $B_{21-30(T)}$	73
6.1.1.	Photolytische Abspaltung und Reinigung des geschützten Dekapeptids	73
6.1.2.	Schutzgruppenabspaltung mit HF und Reinigung des Dekapeptids	77
6.1.3.	Reinheitskontrolle und physikalische Eigenschaften	79

6.2. Isolierung des C-terminalen Dekapeptids $B_{21-30(M)}$ 80
6.2.1. Photolytische Abspaltung und Reinigung des geschützten Dekapeptids 80
6.2.2. Schutzgruppenabspaltung mit HF und Reinigung des Dekapeptids 83
6.2.3. Reinheitskontrollen und physikalische Eigenschaften 84
6.3. Aufarbeitung der Rinderinsulinsequenz B_{1-30} 86
6.3.1. Photolytische Abspaltung 86
6.3.2. Schutzgruppenabspaltung mit HF 86
6.3.3. Oxidative Sulfitolyse 87

C. ZUSAMMENFASSUNG 89

D. LITERATURVERZEICHNIS 91

A. ALLGEMEINER TEIL

1. Einleitung

Peptide und Proteine spielen eine zentrale Rolle in jedem Organismus. Dort werden sie auf biosynthetischem Wege innerhalb von Sekunden bzw. Minuten aufgebaut, während man z.B. für die erste Chemosynthese des Insulins etwa zwei Jahre brauchte. So betrachtet, scheint die recht aufwendige Arbeit der Synthese von Peptiden und Proteinen im Labor wenig erfolgversprechend zu sein. Dennoch gibt es verschiedene Gründe, die eine Beschäftigung mit der Synthese und chemischen Modifikation dieser Stoffe rechtfertigen:

- Die Bestätigung einer vorgeschlagenen Primärstruktur durch die Chemosynthese ist trotz modernster analytischer Techniken immer noch der sicherste Beweis.

- Mit Hilfe synthetischer Analoga können Zusammenhänge zwischen strukturellen Parametern und der biologischen Wirkung aufgeklärt werden.

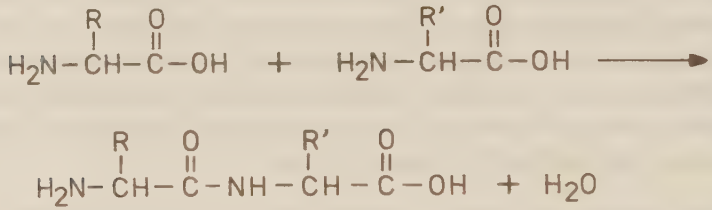
- In der pharmakologischen Wirkung zeigen einige sequenzvariierte, synthetische Peptide eine höhere Aktivität als die in der Natur vorkommenden. Kettenverlängerungen besitzen prinzipielles Interesse hinsichtlich der Erzielung von Depotwirkung.

Heute stehen eine ganze Reihe von Möglichkeiten zur Synthese von Peptiden und Proteinen zur Verfügung. Dennoch fehlt bisher eine Methode, die eine schnelle Synthese von sauberen Peptiden und Proteinen jeder gewünschten Größenordnung ermöglicht. Deshalb ist nicht nur eine Beschäftigung mit der Synthese von Peptiden, sondern auch mit ihrer Methodik sinnvoll.

2. Methoden der Peptidsynthese

2.1. Grundprinzip der Peptidsynthese

Formal beruht die Knüpfung einer Peptidbindung auf der Acylierung der Aminofunktion einer Aminosäure durch eine zweite Aminosäure:



Um einen eindeutigen Verlauf dieser Reaktion zu gewährleisten, müssen folgende Anforderungen erfüllt sein:

- Die Verknüpfung muß unter Beibehaltung der optischen Reinheit der Aminosäuren, also ohne Razemisierung erfolgen.
- Alle funktionellen Gruppen - mit Ausnahme der an der Peptidknüpfung beteiligten Amino- bzw. Carboxylgruppe - müssen während der Reaktion geschützt sein.
- Die Carboxylgruppe der zu kuppelnden Aminosäure muß in einer ausreichend aktivierten Form vorliegen.

Grundsätzlich kann man daher die Chemie der Peptidsynthese in die Gebiete der Schutzgruppentechnik und der Kupplungsmethoden einteilen.

2.2. Schutzgruppen

Prinzipiell unterscheidet man zwischen intermediären und konstanten Schutzgruppen. Konstante Schutzgruppen haben die

Aufgabe, nicht an der Peptidbindung beteiligte funktionelle Gruppen während des gesamten Syntheseverlaufs zu blockieren. Dagegen sollen intermediäre Schutzgruppen nur die bei einem bestimmten Syntheseschritt nicht beteiligten α-Amino- und α-Carboxylgruppen schützen und anschließend selektiv abspaltbar sein. Beide Arten von Schutzgruppen sollten unter milden Bedingungen, quantitativ und ohne Einfluß auf das Endprodukt wieder entfernt werden können.

Die genannten Anforderungen haben zur Entwicklung einer großen Anzahl von Schutzgruppen geführt. Eine umfangreiche Übersicht findet man in der angegebenen Literatur (1-5).

2.3. Kupplungsmethoden

Alle bekannten Kupplungstechniken beruhen auf einer Aktivierung der an der Reaktion beteiligten Carboxylgruppe. Bekannt sind mehr als 50 verschiedene Aktivierungsmöglichkeiten (1), von denen aber nur einige Bedeutung erlangt haben. Dazu gehören die DCCI-Methode (6), die Azid-Kupplung (7), die Verwendung gemischter Anhydride (8-10), sowie einige Verfahren, die der Methode der aktivierten Ester (2,11-13) zuzurechnen sind.

2.4. Strategie der Peptidsynthese

2.4.1. Klassische Synthese

Bei der klassischen Synthese werden die Kupplungsschritte in homogener Lösung durchgeführt. Dabei ist es prinzipiell möglich, im Sinne eines rein stufenweisen Aufbaus eine Aminosäure nach der anderen zu kuppeln (14), oder auch Peptidfragmente durch eine Fragmentkondensation miteinander zu verknüpfen (15). Nach jedem Reaktionsschritt muß das entstandene Peptid durch Kristallisation oder Säulenchromato-

graphie gereinigt werden. Bei einer Sequenzlänge von mehr als 30 Aminosäuren erhält man bei dieser Methode meist nur noch unbefriedigende Ergebnisse. Dennoch konnten nach dieser Methode einige Peptide erfolgreich synthetisiert werden, wobei vor allem die Synthesen von Secretin (16), ACTH und Glucagon (15) zu erwähnen sind.

2.4.2. Synthese am unlöslichen polymeren Träger

Die Nachteile der klassischen Methode umgeht R.B. Merrifield mit einer 1963 eingeführten Synthesestrategie am festen polymeren Träger (5,17). Eine Aminosäure wird über ihre Carboxylgruppe an eine Polystyrolmatrix gebunden und dann vom C-terminalen Ende her die Peptidkette aufgebaut. Dadurch können die zeitraubenden Reinigungsschritte nach jedem Syntheseschritt durch einen einfachen Wasch- und Filtriervorgang ersetzt werden. Außerdem werden durch Anwendung hoher Überschüsse der zu kuppelnden Komponente große Reaktionsausbeuten erreicht. Durch Einfügen bestimmter Ankergruppen (5) zwischen das Polymer und das Peptid können die Abspaltungsbedingungen am Syntheseende variiert werden. Neben den üblichen säure- bzw. base-katalysierten hydrolytischen und hydrogenolytischen Methoden scheint die photolytische Abspaltung (31) in Bezug auf Reinheit und Quantität am vielversprechendsten zu sein. Interessant ist auch die Verwendung einer Ankergruppe, die alle bisher genannten Abspaltungsmethoden vereint und zusätzlich noch eine durch nukleophile Reagenzien ermöglicht (32,33).
Die Einfachheit der Arbeitsweise bei der sogenannten Solid-Phase-Methode ermöglichte auch eine Automatisierung der Synthese (18). Zudem konnte gezeigt werden, daß unter den Bedingungen der High Performance Liquid Chromatography (HPLC) eine Peptidsynthese am Merrifield-Träger im reinen Durchflußverfahren möglich ist (19).

Außer dem von Merrifield eingeführten Polystyrolharz sind noch eine ganze Reihe anderer unlöslicher Polymere zur Anwendung gekommen (20), die aber keine Bedeutung erlangt haben. Obwohl in einer Studie über die Quellungseigenschaften (21) dem Merrifield-Träger auch eine solubilisierende Wirkung zugeschrieben wird, läßt diese Methode in einer kritischen Betrachtung (22,23) doch Wünsche offen. Da quantitativer Umsatz sowie vollständige Entfernung der Schutzgruppen nicht immer erreicht werden können, entstehen Rumpf- und Fehlsequenzen (24), die sich nach Abspaltung des Peptids vom Träger nur schwer oder gar nicht abtrennen lassen.
Dennoch wurden eine Vielzahl von Polypeptiden beschrieben, die nach der Solid-Phase-Methode synthetisiert wurden:

Insulin-A/B-Ketten (25a) (21/30 Aminosäuren)
Cytochrom c (26) (104 Aminosäuren)
Lysozym (27) (129 Aminosäuren)
Ribonuclease T_1 (28) (104 Aminosäuren)
ACTH (29) (39 Aminosäuren)
Glucagon (30) (29 Aminosäuren)

Auch durch Kupplung von Peptidfragmenten am Polystyrolträger ist es gelungen, größere Peptide wie z.B. die Insulin-C-Kette (25b) (31 Aminosäuren) mit guten Ergebnissen zu synthetisieren. Das bevorzugte Synthesegebiet der Merrifield-Technik liegt aber bei Peptiden mit einer Sequenzlänge von 10 bis 15 Aminosäuren.

2.4.3. Synthese am löslichen polymeren Träger

Die Verwendung eines löslichen polymeren Trägers wurde erstmalig 1965 von M. Shemyakin (34) vorgeschlagen, um einige der bei der Solid-Phase-Methode aufgetretenen Nachteile zu beseitigen. Doch zeigten die Reaktionen beim verwendeten unvernetzten Polystyrolträger kinetisch uneinheitliches

Verhalten (23). Außerdem konnte man die Probleme beim Abtrennen niedermolekularer Verunreinigungen nicht befriedigend lösen. Mit der Einführung des polymeren Trägers Polyoxyethylen durch E. Bayer und M. Mutter wurde die eigentliche Liquid-Phase-Methode begründet (35-37). Diese Methode verbindet die Vorteile der Arbeitsweise der Solid-Phase-Technik mit denen der klassischen Synthese. Das Peptid wird, an ein Polyoxyethylen (Molmasse 3 000 - 20 000) gebunden, in Lösung stufenweise aufgebaut, wobei die bei Peptidsynthesen üblichen Lösungsmittel verwendet werden. Durch den Einsatz von Überschüssen an Kupplungskomponente wird ein rascher und quantitativer Umsatz erreicht. Kinetische Untersuchungen haben gezeigt, daß die Kupplungsgeschwindigkeiten der mit POE veresterten Aminosäuren mit denen der klassischen Synthese vergleichbar sind (38). Nach beendeter Reaktion wird durch Zutropfen von Diethylether das Polymerpeptid quantitativ ausgefällt. Nicht umgesetzte niedermolekulare Verunreinigungen bleiben in Lösung und können somit durch Filtrieren vom kristallin anfallenden Polymerpeptid abgetrennt werden. Zur Optimierung der Abspaltungsbedingungen des Peptids vom Träger sind prinzipiell die gleichen Ankergruppen (5,39-41) verwendbar wie bei der Solid-Phase-Methode.

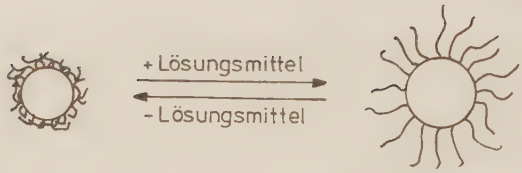
Nach der Liquid-Phase-Technik wurden bisher einige interessante Oligopeptide wie z.B. Sequenz B_{21-30} des Rinderinsulins (54), Oxytocin (47), LH-RH (48), sowie Leu- und Met-enkephalin (49) erfolgreich hergestellt. Bei der Synthese längerer Peptidsequenzen traten aber Löslichkeitsprobleme und Rumpfsequenzbildungen auf (50-52). Beobachtete Abspaltungsprobleme längerer Sequenzen konnten mit Hilfe eines photolabilen Ankers (52,53) gelöst werden.

2.4.4. Fest-Flüssigphasen-Technik

Eine Kombination der bisher genannten Solid- und Liquid-Phase-Methode stellt die Fest-Flüssigphasentechnik nach Frank und Hagenmaier dar (42,43). Das Peptid wird auch an einem Polyoxyethylen wie in der Liquid-Phase-Methode aufgebaut. Die zu kuppelnde, carboxylaktivierte Aminosäure ist mit der α-Aminofunktion über eine säurelabile Urethanbindung an eine unlösliche Polystyrolmatrix gebunden. Die Reinigung erfolgt deshalb lediglich über eine einfache Filtration. Auf diese Weise wurde LH-RH in großer Reinheit hergestellt (44). Eine Modifizierung dieser Technik stellt die Methode nach Jung und Mitarbeitern dar (45,46), bei der die an die Polystyrolmatrix fixierte Aminosäure als Aktivester umgesetzt wird.

3. Problemstellung

Ein Polymer, das aus einer unlöslichen Polystyrolmatrix und einem löslichen Polyoxyethylen mit freien Hydroxylgruppen besteht, bietet sich als Träger für Peptidsynthesen an. Von einem solchen Polymer kann erwartet werden, daß es die Vorteile der Solid-Phase-Technik mit denen der Liquid-Phase-Methode verbindet. Das bedeutet, es besitzt sowohl die Eigenschaft der leichten Filtrierbarkeit in jedem Lösungsmittel als auch die der Solubilisierung des Peptids und der damit verbundenen homogenen Reaktionsführung. Da das Polyoxyethylen sich bei einem solchen Polymer auf der Oberfläche der vernetzten Matrix befindet und im wesentlichen aus den Polystyrolkugeln herausragt, wird in geeigneten Lösungsmitteln das Peptid wie von Tentakeln durch die POE-Ketten von der Polystyrolmatrix ferngehalten:



Damit könnten auch die am vernetzten Polystyrol auftretenden Diffusions- und Matrixprobleme bei einer Peptidsynthese im Durchflußverfahren an Bedeutung verlieren.

Bei einer erfolgreichen Synthese solcher Polymere wurde anhand kinetischer Untersuchungen festgestellt, daß die Geschwindigkeitskonstanten bei einer Peptidkupplung größer sind als bei vergleichbaren Reaktionen am reinen Polyoxyethylen (55). Allerdings waren die Beladungen, die mit POE größerer Molmassen als 1 000 erreicht wurden, gering. Dennoch konnte die prinzipielle Eignung des Polymers als Träger in Peptidsynthesen gezeigt werden (56).

In dieser Arbeit sollte daher zunächst untersucht werden, ob sich die Beladungen des Polystyrols mit Polyoxyethylen optimieren lassen. Um in einer Peptidsynthese gute Ausbeuten an Peptid zu erhalten, muß eine ausreichend große Zahl verfügbarer Hydroxylgruppen am immobilisierten Polyoxyethylen vorhanden sein. Dies wird aber nur erreicht, wenn möglichst viele der am Polystyrol ursprünglich vorhandenen funktionellen Gruppen durch die Hydroxylgruppen des POE ersetzt werden.

Desweiteren sollte geprüft werden, inwieweit sich das Polymer für die anspruchsvolle Synthese größerer Peptide eignet. Als Modellpeptid hierfür bot sich die Insulin-B-Kette an, da sie abgesehen von ihrer Größe einige komplizierte, trifunktionelle Aminosäuren enthält. Zudem sollte die Möglichkeit der photolytischen Abspaltung polymergebundener Peptide

verschiedener Länge von diesem Träger untersucht werden. Zu diesem Zweck wird der Einsatz eines BOC-Aminosäure-(4-carboxy-2-nitro)benzylesters (53) zur Einführung der C-terminalen Aminosäure und des photolabilen Ankers an einem Polymer dieser Art getestet.

4. Insulin

4.1. Struktur und Funktion

Insulin besteht aus zwei Peptidketten, der A-Kette (acidic chain) mit 21 und der B-Kette (basic chain) mit 30 Aminosäurebausteinen, die über zwei Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Außerdem ist in der A-Kette noch eine intrachenare Disulfidbrücke enthalten (57,58).

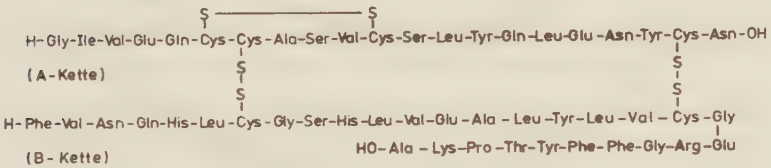


Abb. 1: Primärstruktur des Rinderinsulins

Insuline verschiedener Spezies zeigen trotz unterschiedlicher Aminosäuresequenz in den üblichen biologischen Tests etwa die gleiche Aktivität. Einige Unterschiede in der Aminosäuresequenz sind z.B.:

Humaninsulin	:	A8-10	Thr-Ser-Ile
		B30	Thr
Schweineinsulin	:	A8-10	Thr-Ser-Ile
Schafinsulin	:	A8-10	Ala-Gly-Val

Im Organismus wird Insulin in den B-Zellen der Langerhansschen Inseln gebildet. Das eigentliche Primärprodukt ist das Prä-Proinsulin (59), aus dem durch Peptidase das Proinsulin (60) abgespalten wird. Erst hieraus wird enzymatisch das Insulin gebildet. Im Proinsulin sind A- und B-Kette über die C-Kette (connecting chain) zu einem Einkettenpeptid miteinander verbunden. Durch die daraus resultierende räumliche Anordnung ist eine optimale Knüpfung der Disulfidbrücken möglich.

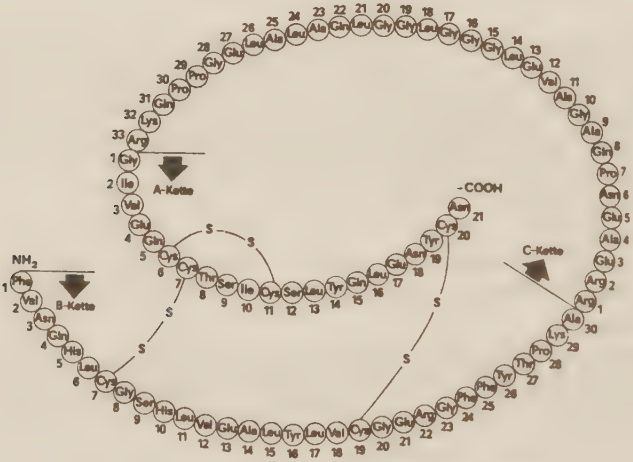


Abb. 2: Primärstruktur des Schweine-Proinsulins

Durch seine senkende Wirkung auf den Blutzuckerspiegel wirkt Insulin als Regulativ der Hyperglykämie. Deswegen hat es eine große Bedeutung bei der Bekämpfung des Diabetes mellitus.

4.2. Insulinsynthesen

Industriell wird Insulin durch Extraktionsverfahren vorrangig aus Pankreata von Schwein und Rind gewonnen. Die erste Chemosynthese gelang 1963 H. Zahn und Mitarbeitern (61). In den beiden folgenden Jahren wurde noch zweimal über erfolgreiche Synthesen berichtet (62,63), die sich aber nur in methodischen Details voneinander unterscheiden. Allen liegt ein Aufbau der beiden Teilketten nach der klassischen Methode zu Grunde, gefolgt von einer oxidativen Verknüpfung. Da dabei zahlreiche isomere Disulfide entstehen, treten hohe Ausbeuteverluste auf (64). Die biologische Aktivität eines solchen Rekombinats von A- und B-Kette beträgt im allgemeinen 1-2 %, läßt sich aber durch Einsetzen von großen Überschüssen eines Reaktionspartners auf 10-20 % steigern (65).
Seither wurde an einer Verbesserung dieser Synthesemöglichkeit gearbeitet, wobei der stufenweise Aufbau (25,71) und insbesondere eine Fragmentkondensation (72,73) am polymeren Träger einen erheblichen Zeitgewinn erbrachten.

Zur Vermeidung eines möglichen Disulfidaustausches wurde auch eine Synthese unter selektiver Knüpfung der Disulfidbrücken durchgeführt (66). Ein solcher Weg stellt aber enorm hohe Anforderungen an die Schutzgruppentechnik und ist nicht allgemein gangbar.

Eine weitere Synthesemöglichkeit versucht den biologischen Weg zu imitieren und führt über den Aufbau des Proinsulins (67,68). Allerdings ist dieser Syntheseweg zu aufwendig, um im größeren Maßstab genutzt werden zu können.

Eine weitere, auch für industrielle Zwecke interessante Methode ist die sogenannte Semisynthese. Bei diesem Verfahren geht man von chemisch oder besser enzymatisch partiell abgebauten Peptidketten aus, die mit synthetisch abgewandelten Teilsequenzen wieder verlängert werden. Auf

diese Weise sind eine Vielzahl sequenzvariierter Insuline (149) synthetisiert worden. Besonders der durch Trypsin katalysierte Austausch des Alanins an der Stelle B_{30} im Schweineinsulin gegen Threonin bietet eine einfache, technisch nutzbare Methode, Humaninsulin zu synthetisieren (150-152).

Eines rein biologischen Verfahrens, der sogenannten Gentechnologie bedient sich in jüngster Zeit eine weitere Insulinsynthese (69,70), die auch industriell genutzt wird.

5. Der polymere Träger PS-POE

5.1. Allgemeines

S.L. Regen und L. Dulak (74) synthetisierten 1977 erstmals Pfropfcopolymere aus vernetztem Polystyrol und POE-monomethylether (Molmasse 600) als Cosolvens für die Phasentransferkatalyse. A. Warshawsky (75) gelang zwei Jahre später die Synthese immobilisierter cyclischer Polyether durch Verwendung von Polyoxyethylen mit einer Molmasse bis 600. Er bezeichnete diese Copolymere aufgrund ihrer guten Komplexierungseigenschaften (75-77) als polymere Pseudokronenether. Ähnlich können auch immobilisierte lineare Polyether dargestellt und als Träger für Metallkatalysatoren (55,78) und Peptidsynthesen (79) eingesetzt werden.

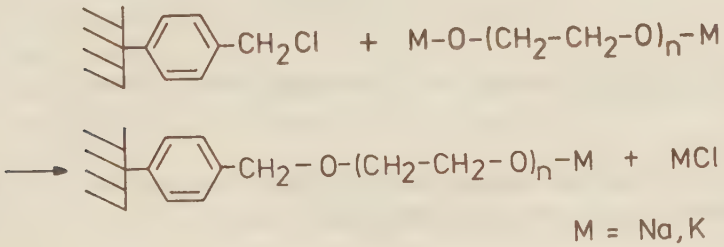
Diese relativ kurzen POE-Ketten am Polystyrol kann man auch als Spacer ansehen, ähnlich denen, die in Peptidsynthesen von M.A. Tilak (80) bzw. E. Bayer (81) mit 6 C-Atomen oder von J.T. Sparrow (82) mit 22 C-Atomen beschrieben wurden. Kinetische Untersuchungen (55,79) an dem Copolymer Polystyrol-POE zeigen Reaktionsgeschwindigkeiten, die auf eine homogene Reaktion in Lösung schließen lassen.

In der Liquid-Phase-Technik ist eine POE-Molmasse von über 6000 notwendig, um eine ausreichende Solubilisierung auch

längerer Peptide zu gewährleisten (83). Überträgt man diese Tatsache auf immobilisierte Systeme, so bedeutet dies, daß für die Synthese größerer Peptide auch beim PS-POE weitaus größere Molmassen des POE als 600 erforderlich sind.

5.2. Untersuchungen zur Darstellung von immobilisiertem POE durch Veretherung von Polystyrol und Polyoxyethylen

Die Polystyrol-POE-Pfropfcopolymere wurden nach dem Prinzip der Williamson-Ethersynthese durch Umsetzung von chlormethyliertem (1.25 meq/g), vernetztem Polystyrol und POE-Alkalisalzen dargestellt:



Da bei diesem Syntheseweg keine POE mit einer größeren Molmasse als 3000 (n = 68) einsetzbar sind (56), wurde versucht, durch Variation der Reaktionsbedingungen eine hohe Umsatzrate zu erreichen.

Als Grundlage zur Berechnung der erreichten Beladung dienten zum einen die Massendifferenz des Polystyrols vor und nach der Reaktion, zum anderen der aus der Elementaranalyse erhaltene Sauerstoffgehalt.

Den POE-Gehalt M_{POE} des Copolymers in mMol POE pro g Copolymer berechnet man nach:

$$M_{POE} = \frac{S \cdot 1000}{MM_{POE}}$$

wobei $S = \frac{O_{EA}}{O_{POE}}$ mit O_{EA}: Sauerstoffgehalt des Copolymers
und O_{POE}: Sauerstoffgehalt von POE = 36.36 %

MM_{POE}: Molmasse von POE

Hieraus erhält man die Beladung B_{POE} des Harzes mit POE in %:

$$B_{POE} = \frac{M_{POE}}{Cl_0 \cdot (1-S)} \cdot 100$$

wobei Cl_0: Chlorgehalt des Ausgangspolymers in mMol

Aus der Gewichtszunahme des Polystyrols ergibt sich die Beladung D_{POE} des Harzes mit POE in % nach:

$$D_{POE} = \frac{U_{POE}}{Cl_0 \cdot P_0} \cdot 100$$

wobei $U_{POE} = \frac{P-P_0}{MM_{POE}} \cdot 1000$ mit P_0: Gewicht des eingesetzten Polystyrols
und P : Gewicht des Copolymers

Zum einen wurden größere Beladungen durch Erhöhen der Reaktionstemperatur erreicht. Außerdem konnten durch den Einsatz von Kalium anstelle von Natrium bzw. Natriumhydrid bei der Bildung der Alkalisalze die Beladungen am Polystyrol mit POE

von 15-20 % auf ca. 30 % gesteigert werden. Dieser Effekt wurde schon bei der Veresterung am chlormethylierten Polystyrol beobachtet (84) und ist der in der 1. Hauptgruppe des Periodensystems von oben nach unten zunehmenden Ionengröße zuzuschreiben.

Das Verhältnis von POE zu Polystyrol während der Reaktion betrug 3:1, bezogen auf eine Endgruppe des POE und den Chlorgehalt des Polystyrols. Größere Überschüsse an POE würden zu geringe Ausbeuten an verwendbarem Pfropfcopolymer ergeben, während geringere Überschüsse die Ringbildung zu Pseudo-Kronenethern in nicht mehr vertretbarer Weise begünstigen. Trotzdem kann auch bei diesem Überschuß eine Ringbildung nicht ausgeschlossen werden. Deshalb wurde in einem anschließenden Veresterungsschritt mit BOC-Glycin die tatsächlich verfügbare Hydroxylgruppenzahl bestimmt. Unter der Annahme einer 100 %igen Veresterung kann damit aus der Aminosäureanalyse direkt die Anzahl der Hydroxylgruppen A_{OH} in meq/g Copolymer entnommen werden. Somit ergibt sich der prozentuale Anteil an Ringschluß im Copolymer zu

$$\Delta_R = \frac{M_{POE} - A_{OH}}{M_{POE}} \cdot 100$$

Alle so ermittelten und relevanten Daten sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Es zeigt sich, daß trotz sorgfältiger Durchführung der Versuche der Anteil der Ringschlußreaktion nicht reproduzierbar auf einem niedrigen Niveau gehalten werden konnte. Der Wert variiert zwischen 0 und 35 %, ohne daß ein Zusammenhang mit den Reaktionsbedingungen hergestellt werden könnte. Der prozentuale Anteil an Ringschlußreaktion ist auf alle Fälle weder von der Reaktionstemperatur noch von dem eingesetzten Alkalimetall abhängig.

Tab. 1: Reaktionsbedingungen und Beladungen der durch Veretherung von Polystyrol und Polyoxyethylen erhaltenen Pfropfcopolymere. Bezeichnungen siehe Text.

Nr.	M	Reaktions-temp. [°C]	O_{EA} [%]	M_{POE} [mMol/g]	B_{POE} [%]	D_{POE} [%]	A_{OH} [$\frac{mMol}{g\ Copol.}$]	Δ_R [%]
1*	Na	25	11.95	0.110	13	13	0.046	58.2
2*	Na	25	16.72	0.150	22	21	0.045	70.0
3*	Na	25	21.39	0.200	48	31	0.016	92.0
4*	Na	25	15.49	0.140	19	24	0.113	19.3
5*	Na	25	11.22	0.100	10	10	0.115	0
6	Na	25	20.59	0.141	19	18	0.118	15.7
7	Na	100	18.19	0.170	27	26	0.131	16.2
8	K	25	18.64	0.171	27	30	0.009	94.7
9	K	25	16.39	0.150	21	34	0.071	52.6
10	K	25	20.41	0.187	33	33	0.137	26.7
11	K	80	20.70	0.191	35	33	0.171	10.5
12	K	80	21.22	0.194	36	32	0.097	50.0
13	K	80	19.74	0.181	30	31	0.011	93.9

* : bereits beschrieben, siehe Literatur (56)

5.3. Stabilität des Polymers

Bei einer Überprüfung der Stabilität der synthetisierten PS-POE-Copolymere wurde festgestellt, daß eine Zersetzung unter gleichzeitiger Oxidation des Polystyrols zu einem carboxylfunktionalisierten Polymer und POE-Bruchstücken stattfindet. Dasselbe war auch von S. Yanagida (85) bei den Pfropfcopolymeren beobachtet worden, deren POE-Ketten nur Molmassen zwischen 200 und 600 aufwiesen.

Beim Stehenlassen der dargestellten Polymere an der Luft konnte mit Hilfe der IR-Spektroskopie ein als Carbonylbande identifiziertes Signal bei 1740 cm^{-1} beobachtet werden. In einem Beobachtungszeitraum, der sich über 12-14 Wochen erstreckte, nahm die Intensität des Signals ständig zu. Im gleichen Zeitraum wurde beim Auswaschen der Polymere mit Methylenchlorid im Filtrat Polyoxyethylen nachgewiesen. Der polymere Rückstand dagegen zeigte im Hydroxamsäuretest mit Hydroxylamin die einer positiven Reaktion entsprechende rote Färbung, die auf das Vorhandensein einer Carboxylgruppe schließen ließ. Es konnte allerdings nicht eindeutig geklärt werden, ob die Zersetzung nur an dem Bindeglied zwischen Polystyrol und Polyoxyethylen oder auch innerhalb der POE-Kette stattfindet.

Im weiteren sollte die Abhängigkeit der Oxidation von der Temperatur und dem das Polymer umgebenden Medium untersucht werden. Dazu wurde das Polymer zunächst mit BOC-Glycin verestert. Verschiedene Proben wurden anschließend an der Luft, im Vakuum, in N_2-Schutzgasatmosphäre und in Methylenchlorid bei 25°C und 80°C stehengelassen, bzw. am Rückfluß gekocht. Nach 24 Stunden und nach 6 Tagen wurden die Polymere mit Methylenchlorid ausgewaschen und die Filtrate einrotiert. Über die Gewichtsdifferenz der Rückstände und der im Filtrat gefundenen Glycingehalte wurden folgende Zusammenhänge ermittelt:

- Bei 80°C waren beim Stehenlassen an der Luft nach 24 Stunden ca. 40 % zersetzt.
- Bei 25°C konnte beim Stehenlassen an der Luft erst nach 6 Tagen 2 % Zersetzung festgestellt werden.
- Im Hochvakuum, in N_2-Schutzgasatmosphäre oder in gequollenem Zustand in Methylenchlorid konnte während des Beobachtungszeitraums keine Zersetzung festgestellt werden.

5.4. Verwendung als Träger in der Peptidsynthese

5.4.1. Peptidaufbau

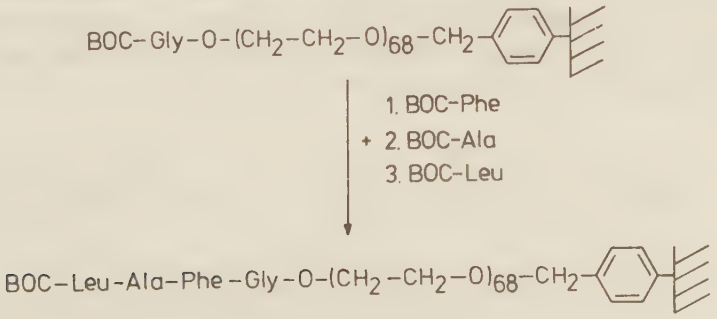
Da das Polymer aufgrund der vernetzten Polystyrolmatrix unlöslich ist, ergibt sich für die Kupplungen zum Peptid prinzipiell dieselbe Arbeitsweise wie in der Solid-Phase-Technik. Zunächst wurden die Hydroxylgruppen mit BOC-Glycin verestert. Das so gebildete BOC-Gly-POE-PS war das Ausgangsmaterial für die weiteren Kupplungen zum gewünschten Peptid. Die Durchführung der Synthesen erfolgte ineiner Schüttelapparatur nach Merrifield. Während der einzelnen Synthesezyklen sind folgende Arbeitsgänge notwendig:

Arbeitsgang	Reagens/Lösungsmittel		Zeit [min]
1	Waschen mit CH_2Cl_2	x3	2
2	Schütteln mit 1.2 N HCl/AcOH	x1	30
3	Waschen mit CH_2Cl_2	x3	2
4	Waschen mit CH_3OH_{abs}	x2	2
5	Waschen mit $CHCl_3$	x3	2
6	Schütteln mit 10 % DIPEA/$CHCl_3$	x1	5
7	Waschen mit $CHCl_3$	x3	2
8	Waschen mit CH_2Cl_2	x3	2
9	Schütteln mit voraktivierter AS in CH_2Cl_2 bzw. DMF	x1	60-120

Arbeitsgang	Reagens/Lösungsmittel		Zeit [min]
10	Waschen mit CH_2Cl_2	x3	2
11	Schütteln mit 5 ml Ac_2O + 2.5 ml NMM in CH_2Cl_2	x1	15
12	Waschen mit CH_2Cl_2	x3	2
13	Waschen mit CH_3OH_{abs}	x2	2

Vor der Kupplung der ersten Aminosäure an das Trägerpolymer wurde der Synthesezyklus mit Arbeitsgang 11 begonnen, um eventuell noch vorhandene freie Hydroxylgruppen zu acetylieren. Dabei wurde die Reaktionszeit auf 45 Minuten erhöht.

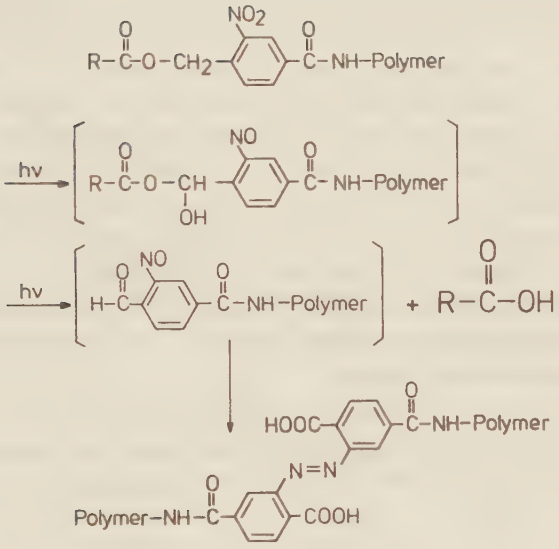
Während eines Kupplungsschrittes wurde durch einen Umsatztest (86) mit Ninhydrin auf noch vorhandene freie Aminogruppen geprüft. Nach jeder Kupplung erfolgte eine Aminosäureanalyse. Im Unterschied zu früheren Synthesen war das Polymer nicht unter Verwendung der Natriumsalze von Polyoxyethylen hergestellt worden, sondern über die entsprechenden Kaliumsalze. Deshalb sollte zunächst festgestellt werden, ob sich dadurch das Verhalten des Polymers in einer Peptidsynthese eventuell verändert. Zu diesem Zweck wurden die in Tabelle 1 angeführten Polymere 10, 11 und 12 vereinigt und folgendes Polymerpeptid aufgebaut:



Auffallend war, daß nach dem Kupplungsschritt die Aminosäureanalyse immer um ca. 20 % zu hohe Werte für die zuletzt gekuppelte Aminosäure ergab, das heißt das Verhältnis von polymergebundenem Peptid zu zuletztgekuppelter Aminosäure betrug 1:1.2. Diese Tatsache konnte auch nicht durch wiederholtes Waschen mit polareren Lösungsmitteln wie DMF oder Essigsäure behoben werden. Erst mit der Abspaltung der BOC-Gruppe im nachfolgenden Zyklus fiel der Analysenwert und zeigte dann ein Verhältnis von 1:1 der Aminosäuren an. Dieses Phänomen läßt auf eine stark resorbierende Eigenschaft des so dargestellten Polymers schließen, für die keine Erklärung gefunden werden konnte. Diese Eigenschaft konnte allerdings nur bei den mit POE-Kaliumsalzen hergestellten Polymeren in diesem Ausmaß beobachtet werden. An den mit POE-Natriumsalzen synthetisierten Copolymeren konnte das C-terminale Tetrapeptid der Rinderinsulin-B-Kette mit gutem Erfolg aufgebaut werden (56).

5.4.2. Abspaltung eines Tetrapeptids unter photolytischen Bedingungen

Seit den ersten Untersuchungen über eine photolabile Schutzgruppe auf Basis der 2-Nitro-benzylester durch A. Patchornik (87) sind eine Reihe von Ankergruppen bekannt geworden, die eine photolytische Peptidabspaltung sowohl am Polystyrol (31-33) als auch am Polyoxyethylen (88,39-41) ermöglichen. Für die Photolyse eines polymerfixierten 2-Nitro-benzylesters gilt folgende Reaktionsgleichung:



Die Strukturformel des am polymeren Träger fixierten, geschützten C-terminalen Tetrapeptids der Rinderinsulin-B-Kette ist in Abbildung 3 wiedergegeben.

Die Abspaltung wurde in Methanol als Lösungsmittel durchgeführt; die Bestrahlungszeit betrug 22 Stunden. Während dieser Zeit wurde ständig Stickstoff durch die Lösung geleitet, um eine Schutzgasatmosphäre aufrecht zu halten und eine gute Verteilung des Polymers im Reaktionsgefäß zu erreichen.

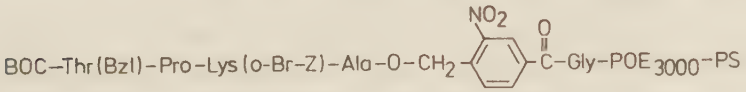


Abb. 3: Strukturformel des C-terminalen Tetrapeptids der Rinderinsulin-B-Kette am PS-POE

Nach beendeter Photolyse wurde das abgespaltene Peptid durch Filtration vom Polymerträger getrennt. Das Polymer hatte während der Reaktion eine orange-braune Farbe angenommen, während das Filtrat nur eine leicht gelbliche Färbung zeigte. Für den Photolyseumsatz wurde aus dem Peptidgehalt des Filtrats ein Wert von 50-60 % ermittelt. Nach Abtrennung löslicher polymerer Anteile im Filtrat durch eine einfache Filtration über eine kurze Kieselgelsäule wird das Peptid durch Gelchromatographie an einer LH 20/MeOH-Säule gereinigt. Das vollgeschützte Peptid wurde so in einer Ausbeute von 25-30 % bezogen auf anfänglich eingesetztes Polymer rein erhalten und charakterisiert.

Nach dem Entfernen der Schutzgruppen mit Fluorwasserstoff (110) und einer anschließenden Ionenaustauschchromatographie an einer CM-Cellulose-Säule konnte das ungeschützte Tetrapeptid

H-Thr-Pro-Lys-Ala-OH

rein in einer Gesamtausbeute von 20-25 % isoliert werden.

5.5. Diskussion

Die Darstellung der polymeren Träger PS-POE mit langen POE-Ketten über eine direkte Ethersynthese konnte unter keinen Bedingungen reproduzierbar gestaltet werden. Insbesondere der immer wieder auftretende große Anteil an Ringschlußreaktionen führte zu unbefriedigenden Ergebnissen. Demzufolge war die Zahl der frei verfügbaren Hydroxylgruppen - trotz manchmal recht hoher Beladungswerte - im Mittel zu gering, um das Polymer als Träger zum Aufbau auch längerer Peptide sinnvoll nutzen zu können. Zusätzlich erschwerend für die gezielte Peptidsynthese war die Unsicherheit in der Analyse des Kupplungsumsatzes aufgrund der resorbierenden Eigenschaften des polymeren Trägers. Dagegen konnte die Tendenz

des Polymers zur oxidativen Zersetzung durch geeignete Aufbewahrungsformen bzw. Reaktionsführung weitgehend zurückgedrängt werden.

Die prinzipielle Möglichkeit des Peptidaufbaus am Träger PS-POE war bereits gezeigt worden. Die photolytische Abspaltung konnte erfolgreich durchgeführt werden. Durch die relativ problemlose Reinigung wurde das C-terminale Tetrapeptid der Rinderinsulin-B-Kette in guten Ausbeuten isoliert und charakterisiert. Somit konnte gezeigt werden, daß eine Peptidsynthese am polymeren Träger PS-POE ohne nachteiligen Auswirkungen auf das Peptid durchführbar ist. Die Methode der Veretherung von Polystyrol mit Polyoxyethylen stellt dagegen keine Möglichkeit dar, ein allen Ansprüchen genügendes Trägermaterial zu synthetisieren. Durch Polymerisation von Ethylenoxid an einem durch Polystyrol immobilisierten Tetraethylenglykol war es W. Rapp (89) gelungen, einen polymeren Träger zu synthetisieren, der bei hohen Beladungswerten eine große Hydroxylgruppenzahl besaß. Grundlegend hierfür war die Erkenntnis, daß bei der Reaktion von chlormethyliertem Polystyrol mit wässriger Natronlauge und Tetraethylenglykol nicht, wie angenommen (55), eine Verseifung zu einem hydroxymethylierten Polystyrol stattfindet. Vielmehr erfolgt auch hier eine Veretherung von Polystyrol mit Tetraethylenglykol. Bedingt durch einen sehr großen Überschuß an Tetraethylenglykol und die wässrigen Reaktionsbedingungen finden aber keine nennenswerten Ringschlußreaktionen statt. An dem so funktionalisierten Polystyrol ist eine anionische Pfropfpolymerisation von Ethylenoxid möglich. Durch geeignete Reaktionsbedingungen lassen sich zudem verschiedene Polymerisationsgrade realisieren, das heißt, diese Methode bietet auch die Möglichkeit, Pfropfcopolymere mit POE-Molmassen über 5000 zu synthetisieren.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Polymere zeigen zwar noch die für das Polystyrol charakteristische Kugelform,

verdeutlichen aber auch, daß die Oberflächen der Kugeln nicht mehr glatt, sondern wie bei einem Wollknäuel mit POE-"Fäden" überzogen sind (145).

Bei einem Kupplungstest unter den Bedingungen einer Peptidsynthese, wie sie in 5.4.1. beschrieben wurden, konnten auch keine nachteiligen Eigenschaften festgestellt werden. Somit besaß dieses Polymer alle Voraussetzungen, die zu Beginn der Arbeit an einen Träger dieser Art gestellt wurden. Es war deshalb Ausgangsmaterial für die im weiteren beschriebenen Synthesen längerer Peptidsequenzen.

6. Synthese von Peptidsequenzen der Rinderinsulin-B-Kette am PS-POE

6.1. Vorbereitung des Polymers

Das verwendete Polymer war durch Aufpolymerisieren von Ethylenoxid hergestellt worden, wobei die POE-Molmasse etwa 5500 betrug.

Zunächst wurde durch einen Veresterungsschritt mit BOC-Glycin eine Aminogruppe eingeführt, an der eine noch folgende Peptidkupplung quantitativ gewährleistet war. Dieser Reaktionsschritt wurde bereits in einer Schüttelapparatur durchgeführt, um die mechanische Belastung weitestgehend auszuschalten, die bei längerem Rühren zur Zerstörung des Polymers führen kann (90).

Durch einen Acetylierungsschritt mit Acetanhydrid wurden anschließend eventuell noch vorhandene Hydroxylgruppen passiviert. Die Einführung des photolabilen o-Nitrobenzylankers erfolgte über das entsprechende Derivat der C-terminalen Aminosäure (53). Zu Beginn des Synthesezyklus standen 3.8 mMol Aminogruppen in 44 g Polymerträger für die Peptidkupplung zur Verfügung.

6.2. Schutzgruppenwahl

Da die α-Aminofunktion durchweg mit der BOC-Gruppe geschützt war, mußten die Schutzgruppen für Drittfunktionen gegen das acide Abspaltungsreagens 1.2 N HCl/AcOH resistent sein. Als weitere Voraussetzungen wurden Stabilität während der Photolyse sowie Abspaltbarkeit durch Fluorwasserstoff verlangt. Letztgenannte Bedingung wurde lediglich von der Mercaptoschutzgruppe des Cysteins nicht erfüllt. Die hierbei verwendete S-Isopropylgruppe ist aber durch oxidative Sulfitolyse leicht entfernbar (91).

So waren die Hydroxylgruppen von Threonin und Serin sowie die γ-Carboxylfunktion der Glutaminsäure mit einer Benzylgruppe geschützt (92-94). Da die Benzylgruppe als Schutz der phenolischen Funktion des Tyrosins gegenüber HCl/AcOH nicht stabil genug ist (95) und bei der Reaktion mit HF zu Nebenreaktionen unter Bildung des 3-Benzyltyrosins neigt (96), wurde die o-ClZ-Schutzgruppe verwendet (97). Ebenfalls aufgrund der größeren Säurestabilität wurde an Stelle der Carbobenzoxygruppe für die ε-Aminofunktion des Lysins die o-BrZ-Schutzgruppe verwendet (98,99).

Für die Guanidino-Funktion des Arginins kamen bis zur Stufe des Dekapeptids sowohl die Tosyl- (100) als auch die leichter und ohne Nebenreaktionen abspaltbare p-Methoxybenzolsulfonylschutzgruppe (101) zur Anwendung. Im weiteren Verlauf der Synthese wurde aufgrund experimenteller Daten, auf die im Kapitel 6.2.1. noch näher eingegangen wird, auf die Verwendung der Mbs- zugunsten der Tos-Gruppe verzichtet.

Für den Imidazolschutz des Histidins wurden zwei verschiedene Schutzgruppen verwendet. Während bei einer Synthese nach der Liquid-Phase-Methode das Derivat N^{α}, N^{im}-Di-BOC-His-OH an der Stelle B_{10} nur unbefriedigend kuppelte (51), brachte die Kupplung des Tripeptids BOC-Ser(Bzl)-His(Trt)-Leu-OH gute Ergebnisse (52). Deshalb wurde bei der Synthese an

dieser Stelle dem Tripeptid mit der N^{im}-Tritylschutzgruppe (102-106) der Vorzug gegeben. An der Stelle B_5 wurde Histidin mit der N^{im}-BOC-Schutzgruppe gekuppelt. Grundsätzlich hat der Imidazolschutz die Aufgaben, durch Verminderung des zwitterionischen Charakters von N^{α}-BOC-Histidin die Löslichkeit zu erhöhen und außerdem Nebenreaktionen mit DCCI zu unterbinden. Da die N^{im}-BOC-Gruppe diese Aufgabe nur während der Kupplung erfüllt, ist der N^{im}-Trt-Schutz durch seine größere Stabilität gegenüber HCl/AcOH dauerhafter.

Die Amidfunktionen von Glutamin und Asparagin blieben ungeschützt. Durch Zugabe äquimolarer Mengen HOBt sollten Nebenreaktionen mit DCCI wie z.B. die β-Cyanoalanin-Bildung aus Asparagin zurückgedrängt werden (108).

6.2.1. Untersuchungen zur Mbs-Gruppe als Schutz der Guanidinofunktion des Arginins

Bereits in einer Synthese der Insulin-B-Kette nach der Liquid-Phase-Methode (52) waren Probleme bei der Kupplung des Derivats BOC-Arg(Mbs)-OH aufgetreten, durch die eine gewisse Unsicherheit über den Erfolg dieses Kupplungsschrittes zurückblieb.

Deshalb wurde bei der Synthese am PS-POE eine Probe des Polymerpeptids auf der Oktapeptidstufe entnommen und unter den üblichen Bedingungen mit BOC-Arg(Mbs)-OH gekuppelt. Die Umsatzkontrolle mit Ninhydrin ließ auf einen sehr langsamen Reaktionsverlauf schließen. Es konnten nach zwei Stunden Kupplungsdauer noch mindestens 15 % freie Aminogruppen nachgewiesen werden und auch nach sechs Stunden war der Kupplungsumsatz erst allmählich auf 94 % gestiegen. Dieser Wert wurde auch in einer sechsstündigen Nachkupplung nicht überschritten. Dagegen zeigte die Aminosäureanalyse mit zunehmender Reaktionsdauer eine ständige Vergrößerung des Argininggehaltes auf schließlich über 400 %. In einer nachfolgenden

Kupplung zum Dekapeptid konnten dann aber nur 75 % BOC-Glu(Bzl)-OH gekuppelt werden. Die Aminosäurenzusammensetzung des Polymerpeptids auf der so erreichten Dekapeptidstufe zeigte folgende Werte:

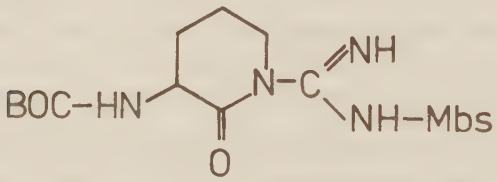
	Gly	Ala	Lys	Pro	Thr	Tyr	Phe	Arg	Glu
beob.:	1.98	1.00	1.00	1.01	0.88	0.97	1.87	4.39	0.75
Theorie:	2	1	1	1	1	1	2	1	1

Abgesehen von der Größe des Argininwerts stimmen diese Ergebnisse mit den Beobachtungen bei der Liquid-Phase-Synthese überein.

Durch entsprechende Blindversuche konnte eine Resorption von BOC-Arg(Mbs)-Anhydrid oder BOC-Arg(Mbs)-OH im Polymerpeptid ausgeschlossen werden. Dazu wurde das Polymerpeptid auf der Oktapeptidstufe genauso wie bei einer normalen Kupplung mit BOC-Arg(Mbs)-Anhydrid bzw. BOC-Arg(Mbs)-OH geschüttelt, allerdings ohne daß zuvor die BOC-Schutzgruppe des Polymerpeptids entfernt worden wäre. In einer anschließenden Aminosäureanalyse des Polymerpeptids konnte kein Arginin nachgewiesen werden. Dagegen wurden bei probeweise durchgeführten Kupplungen von Z-Arg(Mbs)-OH bzw. dem Dipeptid BOC-Glu(Bzl)-Arg(Mbs)-OH an dem gleichen Polymerpeptid ohne besondere Vorkommnisse die entsprechenden Peptidsequenzen erhalten.

Auch in der klassischen Synthese zeigen Z-Arg(Mbs)-OH und BOC-Arg(Mbs)-OH unterschiedliche Verhaltensweisen. Während bei einer Kupplung von Z-Arg(Mbs)-OH mit Glycinmethylester das Dipeptid in hoher Ausbeute isoliert werden konnte, brachte die gleiche Reaktion mit BOC-Arg(Mbs)-OH nur sehr geringe Mengen an identifizierbarem Dipeptid. Dagegen wurde zu 60 % ein einheitliches Produkt isoliert, das keinem der Edukte oder erwarteten Produkte entsprach. Aufgrund der

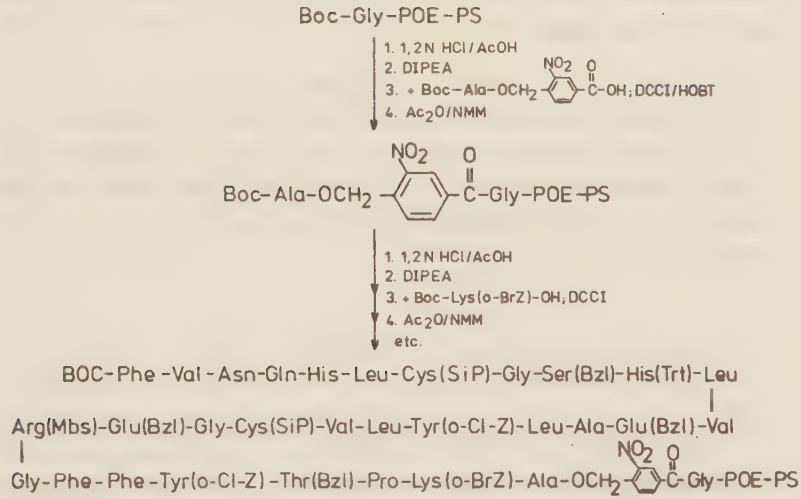
Aminosäureanalyse, Massenspektrometrie, IR- und NMR-spektroskopischer Daten wurde auf die Bildung eines cyclischen Lactams geschlossen, für das folgende Struktur angenommen wurde:



Die Cyclisierung des Arginins zum Lactam war als Nebenreaktion bereits bei der Verwendung der Nitrogruppe zum Schutz der Guanidinofunktion beobachtet worden (148).
Die gemachten Beobachtungen lassen den Schluß zu, daß BOC-Arg(Mbs)-OH für den Einsatz in einer kontrollierten Synthese größerer Peptide am polymeren Träger nicht geeignet ist.

6.3. Synthesezyklus

Der Aufbau des Peptids am immobilisierten Polyoxyethylen erfolgte nach den bei Peptidsynthesen an polymeren Trägern standardisierten Synthesezyklen:



Nach Abspaltung der BOC-Schutzgruppe (Schritt 1) und Neutralisation der freien Aminogruppe (Schritt 2) wurde die Kupplung (Schritt 3) mit einem drei- bis fünffachen Überschuß an Aminosäurekomponente durchgeführt. Der Kupplungsumsatz wurde durch einen Ninhydrintest und einer anschließenden Aminosäureanalyse bestimmt. Danach wurde acetyliert (Schritt 4), um der Bildung von Fehlsequenzen durch eventuell noch vorhandene freie Aminogruppen vorzubeugen. Die Kupplung der nächsten Aminosäure wurde sodann mit Schritt 1 des nächsten Zyklus vorbereitet. Die im einzelnen erforderlichen Arbeitsgänge sind mit denen identisch, die in Kapitel 5.4.1. bereits tabellarisiert wurden.

Die Kupplungen wurden im wesentlichen in Methylenchlorid durchgeführt, nur bei Kupplungen nach der HOBt/DCCI-Methode und bei BOC-Arg(Tos)-OH wurden 50 % DMF zugesetzt. Die HOBt-Aktivestermethode wurde bei Kupplungen von Peptidfragmenten, BOC-Gln, BOC-Asn, BOC-Tyr(o-ClZ)-OH sowie der Einführung des BOC-Alanin-(4-carboxy-2-nitro)benzylesters angewendet. An-

sonsten wurden die Aminosäurederivate als symmetrische Anhydride eingesetzt.

Aufgrund der hervorragenden Quellbarkeit des polymeren Trägers wurde die Abspaltung der BOC-Gruppe durchweg mit 1.2 N HCl/AcOH durchgeführt. Lediglich vor der Kupplung der letzten Aminosäure wurde 55 % TFA/CH_2Cl_2 angewendet, um am Kupplungsende einheitlich freies Histidin vorliegen zu haben.

6.4. Beobachtungen zum Verlauf der Synthese

Sowohl die quantitative Einführung der C-terminalen Aminosäure am polymeren Träger Gly-POE-PS als auch die Kupplungen der weiteren Aminosäuren verliefen bis zur Stufe des Hexadekapeptids ohne nennenswerte Probleme.

Nach der Kupplung zum Dekapeptid waren vom Polymerpeptid 10 g zurückbehalten worden. Die Ergebnisse der Photolyse und Aufarbeitung dieses Peptids sollten mit denen des Produkts verglichen werden, das bei der in Kapitel 6.2.1. erwähnten Kupplung von BOC-Arg(Mbs)-OH und dem daraus resultierenden Dekapeptid erhalten worden war.

Bei der Kupplung von BOC-Ala an der Stelle B_{14} kam eine gewisse Unsicherheit über den quantitativen Umsatz der Reaktion auf. Der Grund hierfür lag in der Interpretation des Ninhydrintests. Da einerseits kleine Nuancen in der Färbung bei der Testreaktion schon relativ große Abweichungen vom quantitativen Umsatz anzeigen, andererseits am Polymer eine mit jeder Kupplung zunehmende Verdünnung der zu detektierenden Aminogruppen stattfindet, war an dieser Stelle nicht mehr gewährleistet, ob sehr schwache Färbungen auch richtig interpretiert würden. Auch die Aminosäureanalyse konnte keine absolute Klarheit mehr über die Quantität der Kupplung geben. Offensichtlich war an dieser Stelle die Grenze einer

sicheren Analytik bei der Bestimmung des Kupplungsumsatzes erreicht. Deswegen wurde ab der Heptadekapeptidstufe nachgekuppelt.

Die Kupplung des Tripeptids BOC-Ser(Bzl)-His(Trt)-Leu-OH zum Dokosapeptid verlief nicht mit dem erwarteten Erfolg. Zwar ließ der Ninhydrintest auf einen annähernd quantitativen Umsatz schließen, doch waren laut Aminosäureanalyse nur 40 % gekuppelt worden. Eine zum Vergleich durchgeführte schrittweise Kupplung konnte den erfolgreichen Einbau von BOC-His(Trt)-OH auch nicht sicherstellen und erfolgte laut Aminosäureanalyse nur zu 25 %. Die weiteren Kupplungsschritte zum Aufbau des Triakontapeptids verliefen zwar ohne Probleme, waren jedoch durch eine weiterhin allmählich abnehmende Zahl der freien Aminogruppen gekennzeichnet. So standen nach der Kupplung von BOC-Asn-OH laut Aminosäureanalyse nur noch 12 % der ursprünglich vorhandenen Aminogruppen zur Verfügung. Dies hatte seine Ursache nur zu einem Teil in den schlechten Umsätzen der letzten neun Kupplungsschritte. So wurde andererseits während der Synthese auch eine ständige Abnahme des relativen Peptidgehaltes am Polymer auf schließlich 40 % des ursprünglichen Werts beobachtet. Diese Verhältnisse werden graphisch in Abbildung 4 verdeutlicht. Als Grundlage zur Berechnung der Daten diente anfänglich der Glycin und ab der Heptapeptidstufe der Lysingehalt. Der Grund für diese Abnahme muß wohl in einer nicht ausreichenden Stabilität der Gly-POE-PS-Esterbindung unter den gewählten Reaktionsbedingungen der Kupplungszyklen gesehen werden.

Am Ende der Synthesezyklen lagen in der Gesamtmenge von 17 g Polymerpeptid 390 mg Rinderinsulin-B-Kette vor.

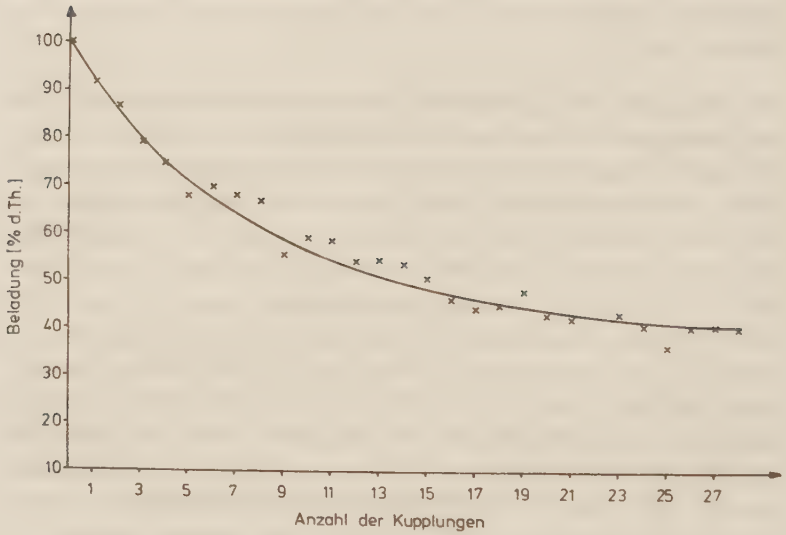


Abb. 4: Peptidbeladung am Polymer in Abhängigkeit von der Kupplungszahl

6.5. NMR-spektroskopische Untersuchungen am Polymerpeptid

Neben Festkörperuntersuchungen mit Hilfe der "Magic-Angle-Spinning-Technik" besteht auch die Möglichkeit, von der gequollenen Polymermatrix in Suspension ein ^{13}C-NMR-Spektrum zu erhalten. Dieses Verfahren war bei Untersuchungen von Polymeren bereits mehrfach genutzt worden (55,89). NMR-Untersuchungen an unlöslichen polymeren Trägern sind bisher nur mit Hilfe der Festkörper-Technik durchgeführt worden. Abbildung 5 gibt das ^{13}C-NMR-Spektrum* des Dekapeptids am

---

* Ich danke Herrn Dr. K. Albert für die Durchführung der Messungen.

polymeren Träger POE-PS in $CDCl_3$ wieder. Die Aufnahmezeit betrug 72 Stunden.

Aufgrund der sehr kurzen Spin-Spin-Relaxationszeiten T_2 der ^{13}C-Atome von Festkörpern bzw. gequollenen Polymeren sind die Halbwertsbreiten der Polystyrolsignale sehr groß. Die Aromatenresonanzen des Polystyrols sind deshalb nur als sehr breiter Buckel geringer Intensität bei 130 ppm zu sehen. Dagegen liegen die T_2-Werte von Lösungen in der Größenordnung der Spin-Gitter-Relaxationszeiten T_1 und führen zu scharfen Signalen geringer Halbwertsbreiten.

Im Spektrum ist deutlich das sehr scharfe und aufgrund der langen Meßzeit äußerst starke Signale des Polyoxyethylens bei 71 ppm zu sehen. Daneben existieren noch weitere Bereiche, die einzelne Signale oder Gruppen solcher Signale erkennen lassen. Diese Bereiche lassen sich eindeutig dem an das Polymer gebundenen Peptid zuordnen. So ist zum Beispiel bei 28 ppm das charakteristische Signal der BOC-Gruppe zu sehen, zwischen 20 und 30 ppm zeigen sich einige weitere für aliphatische C-Atome typische Resonanzen und zwischen 39 und 43 ppm die den α-C-Atomen entsprechenden Signale. Auch die aromatischen Schutzgruppen des Peptids ergeben zwischen 125 und 135 ppm scharfe Signale, die aus dem breiten Buckel des Polystyrolsignals herausragen. Der Bereich der Carboxyl-C-Atome ist, wenn auch nur schwach, bei 170 ppm zu erkennen.

Es kann also davon ausgegangen werden, daß durch die Polystyrolmatrix die Solvatisierung der Polyoxyethylenketten nur wenig beeinflußt wird.

Sowohl Polyoxyethylen als auch das daran gebundene Peptid ragen demnach in die Lösung und können wie lösliches POE solvatisiert werden. Für das Peptid existieren somit Bedingungen, die mit denen der Liquid-Phase-Technik vergleichbar sind.

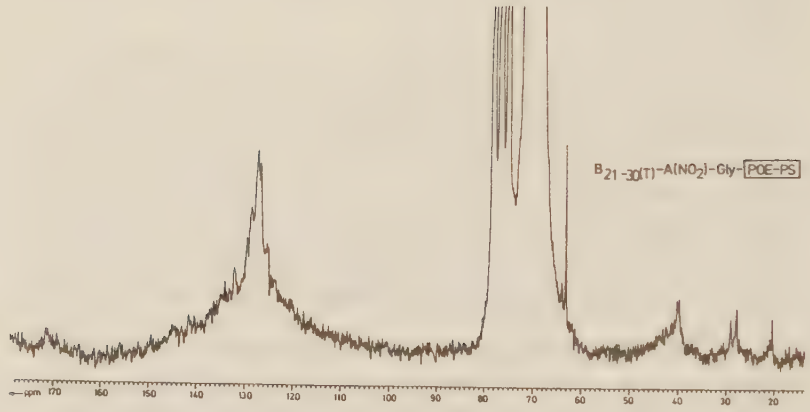


Abb. 5: ^{13}C-NMR des an PS-POE gebundenen Dekapeptids

Weitere Aussagen über die Flexibilität der POE-Ketten lassen sich durch Messung der ^{13}C-Spin-Gitter-Relaxationszeiten T_1 machen (55,89). Eine ausführliche theoretische Behandlung der kernmagnetischen Relaxationsphänomene und daraus resultierende Zusammenhänge zur Molekülbeweglichkeit findet man in der angegebenen Literatur (109).

Die Spin-Gitter-Relaxation T_1 ist die Zeit, nach welcher einem Spinsystem zur vollständigen Relaxation 1/e der Gleichgewichtsmagnetisierung M_0 fehlt und ergibt sich zu

$$T_1 = \frac{\tau_0}{\ln 2}$$

Hierbei ist τ_0 die Nulldurchgangszeit, das heißt die Zeit, bei der bei Einstrahlung eines 90°-Impulses die resultierende Magnetisierung Null wird und man somit kein Signal mehr registriert.

Da ein direkter Zusammenhang zwischen der Molekülbeweglichkeit und dem gelösten Zustand besteht, können mit Hilfe der Spin-Gitter-Relaxationen T_1 Aussagen über das Lösungsverhalten getroffen werden. Dabei gilt, je kleiner die Relaxationszeiten um so kleiner ist auch die Molekülbeweglichkeit. Obwohl ein gequollenes Polymer in seinem Verhalten einem gelösten ähnlicher ist als einem lösungsmittelfreien, liegen die Nulldurchgangszeiten τ_0 des mit 1 % DVB vernetzten Polystyrolträgers unter 0.1 sec. Dagegen liegen die T_1-Werte des polystyrolgebundenen und des freien POE wesentlich höher. Abbildung 6 gibt die ^{13}C-NMR-Spektren zur Relaxationszeitbestimmung des PS-POE auf der Dekapeptidstufe und nach 30 gekuppelten Aminosäuren wieder.

Tab. 2: Nulldurchgangs- und Relaxationszeiten des POE in Polymeren und Polymerpeptiden

Polymer	τ_0 [sec]	T_1 [sec]
POE_{6000}	0.75	1.08
PS-POE_{5500}	0.48	0.69
PS-POE-$B_{30-21(T)}$	0.48	0.69
PS-POE-B_{30-1}	0.52	0.75

Eine Verminderung der Beweglichkeit des Polyoxyethylens im Polymerpeptid nach 10 gekuppelten und nach 30 gekuppelten Aminosäuren gegenüber dem reinen POE-PS konnte nicht festgestellt werden. Inwieweit daraus Rückschlüsse auf eine Solubilisierung des gebundenen Peptids gezogen werden können, bleibt offen. Dazu wäre eine Relaxationszeitbestimmung der N-terminalen BOC-Gruppe notwendig. Diese Messung ist

aber aufgrund der geringen Konzentration der BOC-Gruppe und der damit verbundenen geringen Intensität des Signals nicht möglich.

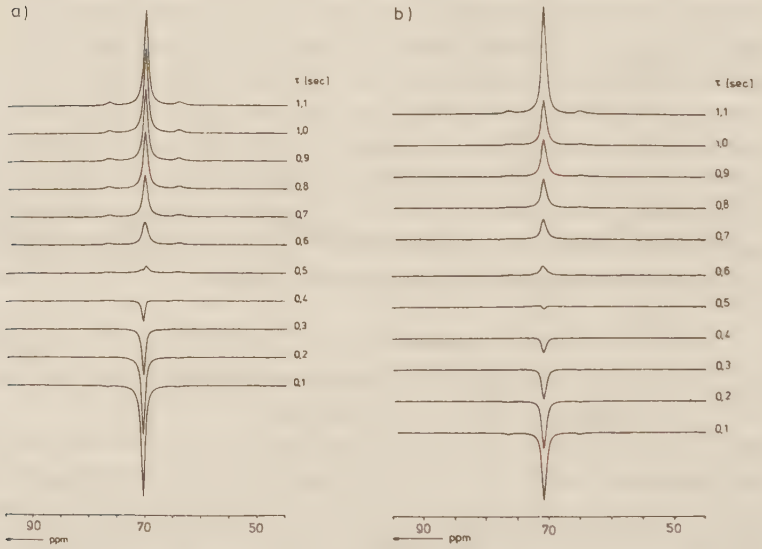
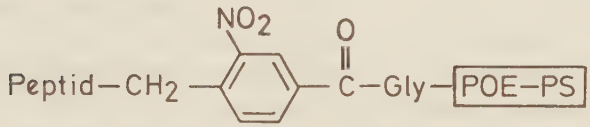


Abb. 6: ^{13}C-NMR-Relaxationszeitbestimmung von a) $B_{21-30(T)}$-POE-PS und b) B_{1-30}-POE-PS

6.6. Photolytische Abspaltung des C-terminalen Dekapeptids

Über Synthesen dieses Peptids in Form verschiedener Derivate und unter Zuhilfenahme unterschiedlicher Strategien ist bereits mehrfach berichtet worden (54,111-116). Auch wurde bereits mit Hilfe der Liquid-Phase-Methode das entsprechende Nonapeptid unter Verwendung derselben Synthesestrategie synthetisiert (119). Die Photolyse wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt, die bereits zur Abspaltung des

Tetrapeptids in 5.4.2. geführt haben.



Peptid ≙

	Boc-	Glu-	Arg-	Gly-	Phe-	Phe-	Tyr-	Thr-	Pro-	Lys-	Ala-
$B_{21-30(T)}$:		Bzl	Tos				o-ClZ	Bzl		o-BrZ	
$B_{21-30(M)}$:		Bzl	Mbs				o-ClZ	Bzl		o-BrZ	

Abb. 7: Polymergebundene Dekapeptidsequenzen

Die Bestrahlungszeit betrug 22 Stunden. Als Lösungsmittel diente bei der Sequenz $B_{21-30(M)}$ Methanol, bei $B_{21-30(T)}$ DMF. Durch die Verwendung von DMF sollte getestet werden, ob in gequollenem Zustand bei der Photolyse grundsätzlich bessere Ergebnisse erzielt werden können als in nicht gequollenem. Durch einfache Filtration wurden nach beendeter Reaktion Lösungsmittel mit Peptid vom polymeren Träger getrennt. Die Filtrate hatten infolge der Photolyse eine gelbe Färbung angenommen, während das Polymer orange-braun geworden war. Außerdem konnte in den Filtraten POE nachgewiesen werden, was auf eine Instabilität des Polymers unter den Bedingungen der Photolyse schließen läßt.
Für den Photolyseumsatz wurden bei der Analyse der Filtrate und der Restbeladung am Polymer bei $B_{21-30(M)}$ 86 % und bei $B_{21-30(T)}$ 81 % gefunden.

6.6.1. Aufarbeitung des Peptids

Durch Filtration über eine kurze, grobkörnige Kieselgelsäule wurden die Rohprodukte von löslichen polymeren Anteilen wie POE befreit. Anschließende säulenchromatographische Trennungen über Kieselgel- und LH 20-Säulen ergaben dünnschichtchromatographisch reine, geschützte Dekapeptide. Die Ursache für den zu hohen Argiringehalt des Peptids $B_{21-30(M)}$ vor und nach der Photolyse konnte nicht gefunden werden. Im Verlauf der Reinigungsoperationen war der Wert allmählich gefallen, ohne daß über den Verbleib in einer der Fraktionen Aufschluß erhalten worden wäre. Am Ende zeigte die Aminosäurenzusammensetzung der geschützten Peptide keine wesentliche Abweichung von den theoretischen Werten.

Tab. 3: Aminosäurenzusammensetzung der gereinigten Dekapeptide

	Glu	Arg	Gly	Phe	Tyr	Thr	Pro	Lys	Ala
$B_{21-30(M)}$									
gesch.	0.98	1.07	0.97	1.91	0.98	0.89	0.95	1.01	1.00
frei	1.05	1.02	1.00	2.01	0.99	0.96	1.01	0.98	1.00
$B_{21-30(T)}$									
gesch.	1.10	1.06	1.01	2.01	1.03	0.96	0.95	1.02	1.00
frei	1.09	0.96	1.01	1.97	0.96	0.98	0.98	1.00	1.00
Theorie	1	1	1	2	1	1	1	1	1

Die Abspaltung der Schutzgruppen erfolgte durch Reaktion mit Fluorwasserstoff (110,142). Nach Reinigung über Ionenaus-

tauschchromatographie an einer CM-Cellulosesäule wurde in beiden Fällen das freie Dekapeptid in einer Gesamtausbeute von 22 % bezogen auf in die Photolyse eingebrachtes Polymerpeptid erhalten.

Die Charakterisierung erfolgte durch Aminosäureanalyse, Elementaranalyse, Massenspektrometrie, Elektrophorese, HPLC und gaschromatographische Überprüfung der Racematanteile (120-123).

6.7. Photolyse der Sequenz B_{1-30}

Die Photolyse der polymergebundenen B-Kette erfolgte in DMSO als Lösungsmittel, da das geschützte Triakontapeptid in Methanol bzw. DMF nicht mehr löslich ist. Ansonsten wurde die Bestrahlung wie beim Tetra- und Dekapeptid durchgeführt. Dabei wurde ein Photolyseumsatz von 60 % erreicht.

Anschließend wurden ohne weitere Reinigung die Schutzgruppen mit Ausnahme der S-Isopropylgruppe am Cystein durch Reaktion mit Fluorwasserstoff entfernt. Bei diesem Reaktionsschritt wurden erhebliche Ausbeuteverluste an theoretisch vorhandener B-Kette beobachtet. Die wässrigen Extrakte enthielten lediglich noch 2-3 % des vor der Photolyse am Träger gebundenen Triakontapeptids. Nach oxidativer Sulfitolyse zur Abspaltung der Cysteinschutzgruppen war die zu erwartende Ausbeute auf 1 % gesunken, das heißt, in der noch vorhandenen Gesamtmenge von 83 mg waren lediglich 2 mg Insulin-B-Kette in der Bisthiosulfatform enthalten. Auf eine weitere Reinigung wurde deshalb verzichtet.

Abbildung 3 gibt eine Übersicht über den hier beschriebenen Aufarbeitungsweg.

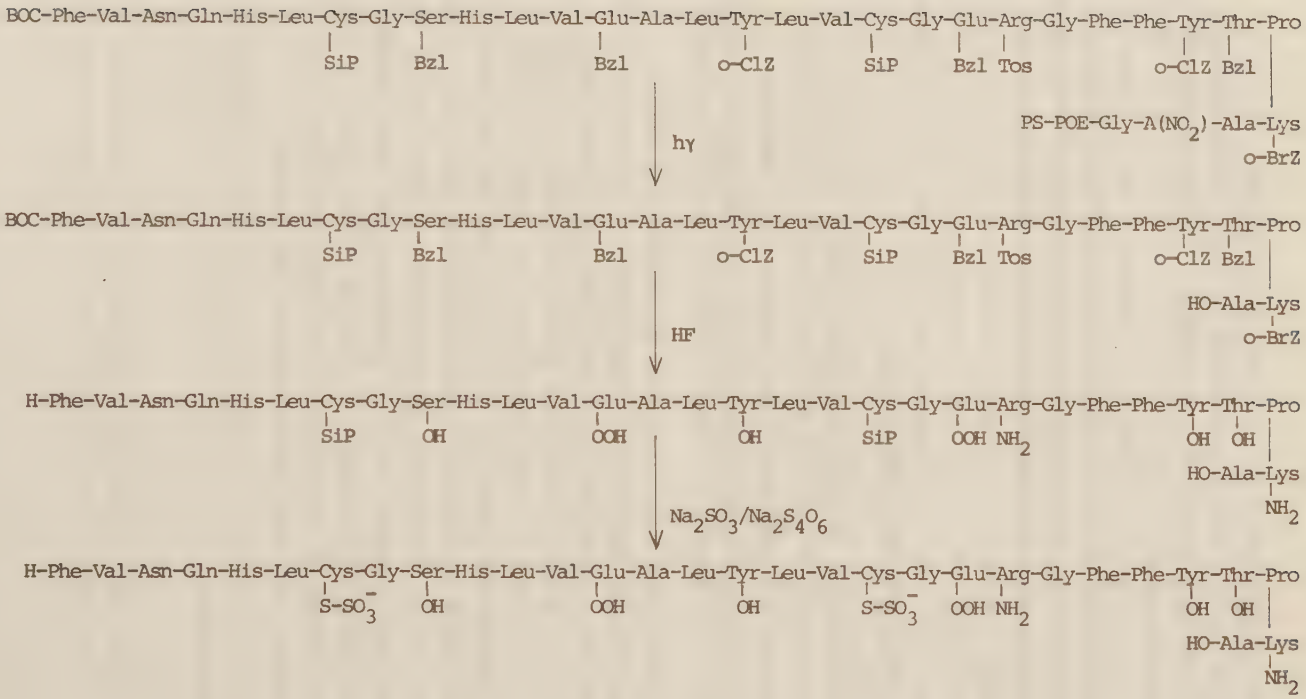


Abb. 8: Aufarbeitungsschema der polymergebundenen Insulin-B-Kette

6.8. Identifizierung der Rinderinsulin-B-Kette

Die hohen Anforderungen, die durch die geringe Konzentration der B-Kette in dem isolierten Produktgemisch an die Analytik gestellt werden, erfüllte die HPLC-Technik. Durch Optimierung der Parameter wurden Trennleistungen erreicht, die die Isolierung von Proteinen und Peptiden aus entsprechenden Naturstoffgemischen ermöglichten (117,118). Diese Parameter wurden im wesentlichen für die HPLC-Untersuchungen übernommen, die an dem synthetisierten Peptid durchgeführt wurden.

Abbildung 9 zeigt die Chromatogramme des synthetischen Produktgemischs und einer käuflich erworbenen, natürlichen Insulin-B-Kette in der Bis-Thiosulfatform. Dabei wurde für den mit einem Pfeil gekennzeichneten Peak dieselbe Retentionszeit wie für die natürliche Insulin-B-Kette gefunden. Die Integration der Peakfläche ergab einen prozentualen Anteil von 2 % an den in dem Gemisch enthaltenen Produkten.

Die Frage, ob es sich bei dem beobachteten Peak um ein einheitliches Produkt handelte, sollte mit Hilfe eines Photodioden-Array-Detektors (143) geklärt werden. Diese Methode erlaubt mit einer entsprechenden Datenbank zu jedem Zeitpunkt der Elution die Aufnahme eines UV-Spektrums. Dabei ist es nicht notwendig, wie bei den üblichen Stop-Flow-Verfahren, die Elution an einer bestimmten Stelle zu unterbrechen. Bisher wurde diese Methode bei Trennungen ähnlicher Indolizin- und Morphinderivate angewendet (146,147).

Die äußerst geringe Konzentration des synthetisierten Peptids und die damit verbundene geringe Intensität der Absorptionen konnte bei der Durchführung der Messungen* nur durch eine

---

* Ich danke Herrn A. Paulus für die Durchführung der Messungen.

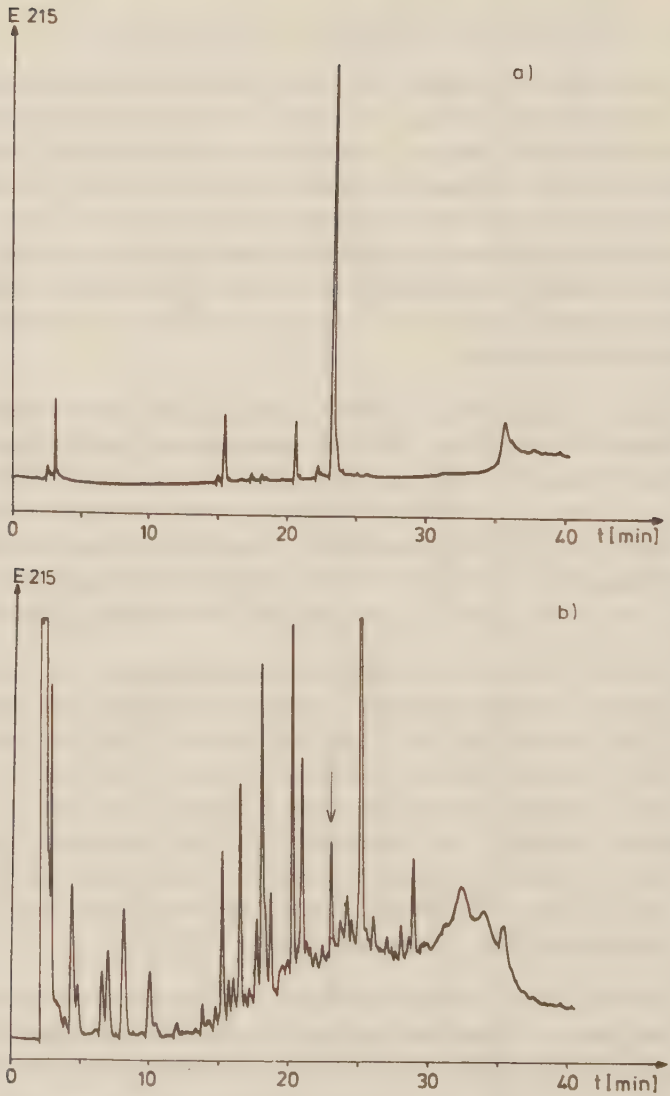


Abb. 9: HPLC von a) natürlicher Rinderinsulin-B-Kette in der Bis-Thiosulfatform und b) dem Produktgemisch mit synthetischer B-Kette

große apparative Verstärkung kompensiert werden. Die Spektren waren deshalb in der graphischen Darstellung etwas verzerrt. Dennoch konnte die Einheitlichkeit des Peaks festgestellt werden. Auch die Lage der Absorptionsmaxima im UV-Spektrum stimmte im wesentlichen mit denen der natürlichen Rinderinsulin-B-Kette überein. Abbildung 10 zeigt die so erhaltenen UV-Spektren. Es kann somit geschlossen werden, daß in dem Produktgemisch synthetische Rinderinsulin-B-Kette enthalten war, die mit der natürlichen vergleichbar ist. Für weitere Identifizierungen war die Ausbeute zu gering.

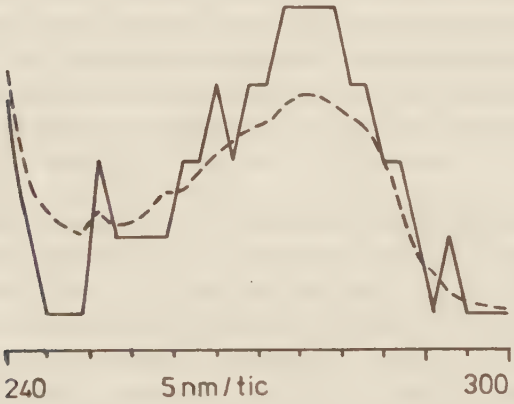


Abb. 10: Photodioden-Array-UV-Spektren von natürlicher (----) und synthetischer (———) B-Kette

6.9. Diskussion

Am immobilisierten Polyoxyethylen wurde mit zum größten Teil schrittweisen Kupplungen die Insulin-B-Kette aufgebaut. Lediglich die Sequenz Ser-His-Leu wurde als Segment gekuppelt. Allerdings ließ sich die Synthese der gesamten

Insulin-B-Kette am polymeren Träger nicht mit dem gewünschten Erfolg abschließen.

Zwar konnte mit Hilfe der HPLC und der Photodioden-Array-Technik synthetische Insulin-B-Kette nachgewiesen werden, eine Reinigung war aber aufgrund zu großer Verunreinigungen nicht möglich.

Als Ursache für die geringe Reinheit des Produkts kommen verschiedene Möglichkeiten in Betracht. Für eine erfolgreiche Synthese größerer Peptide sind quantitative Kupplungen Voraussetzung. Aminosäurederivate, die nicht in optimaler Form vorliegen, können das Kupplungsergebnis erheblich beeinträchtigen. Zumindest bei Histidin, Asparagin und Glutamin schien dies zuzutreffen. Außerdem besteht die Möglichkeit einer nicht mehr ausreichenden Solubilisierung des an der Reaktion beteiligten Sequenzendes.

Aufgrund der NMR-Untersuchungen kann davon ausgegangen werden, daß das Polyoxyethylen bis zum Reaktionsende in Lösung war. Da aberdas für die Kupplung relevante Reaktionszentrum sich mit zunehmender Sequenzlänge vom Polyoxyethylen entfernt, reicht die solubilisierende Wirkung des Polyoxyethylens unter Umständen nicht mehr aus, eine homogene Reaktionsführung zu gewährleisten. Bei einer somit resultierenden heterogenen Reaktion ist ein unvollständiger Kupplungsumsatz wahrscheinlich. Die im Verlauf der Kupplungen beobachtete Abnahme des Peptidgehalts am Polymer ist ein weiterer Faktor, der das Syntheseergebnis negativ beeinflußt. Damit werden auch bei quantitativer Kupplung die Ausbeuten an Peptid erheblich vermindert. Da aufgrund der Untersuchungen, die in Kapitel 5.3. über die Stabilität der Pfropfcopolymere angestellt wurden, eine Zersetzung durch Oxidation unter den Reaktionsbedingungen ausgeschlossen ist, liegt die Ursache hierfür wahrschein-

lich in einer nicht ausreichenden Stabilität der Esterbindung zwischen Polymer und Glycin.

Das C-terminale Dekapeptid der Rinderinsulin-B-Kette konnte ohne größere Probleme gekuppelt werden. Dabei mußte allerdings festgestellt werden, daß eine Verwendung von BOC-Arg(Mbs)-OH in Peptidsynthesen nicht günstig ist. Da aufgrund der offensichtlich recht großen Nukleophilie der Guanidinogruppe ein Angriff auf aktivierte Carboxylgruppen stattfindet, führen Nebenreaktionen zu nicht einheitlichen Produkten.

Aus dem weiteren Reaktionsverlauf beim Aufbau der B-Kette kann geschlossen werden, daß auch die Synthese von Peptidsequenzen mit 15-20 Aminosäuren ohne Probleme verläuft. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß durch die photolytische Abspaltung die Möglichkeit gegeben ist, nach entsprechenden chromatographischen Reinigungsoperationen die vollgeschützten Peptidderivate sehr rein und in guten Ausbeuten zu isolieren. Bei dem so in großer Reinheit isolierten Dekapeptid zeigte sich, daß die Razemisierungsanteile nur sehr gering waren. Diese Tatsache kann auch als großer Vorteil dieser Synthesemethode und der photolytischen Abspaltung gewertet werden. Auf diese Weise dargestellte Peptidsegmente könnten in entsprechenden klassischen Fragmentkupplungen zu großen Peptiden zusammengebaut werden.

Die Abspaltung der Schutzgruppen von Drittfunktionen ließ sich bei den Dekapeptiden mit Fluorwasserstoff gut durchführen. Die dabei resultierenden freien Peptide konnten nach entsprechender Ionenaustauschchromatographie in guten Ausbeuten rein erhalten werden.

Die Eigenschaften des Polymers - leichte Filtrierbarkeit, hervorragende Quellbarkeit, zusätzliche Solubilisierung

durch lange POE-Ketten - lassen die Eignung des PS-POE als Träger in Peptidsynthesen erkennen. Bei vorausgesetzter quantitativer Kupplung könnten durch Automatisierung der Zyklen innerhalb kürzester Zeit längere Peptide aufgebaut werden, ein Dekapeptid z.B. in 24 Stunden.

B. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Allgemeines

1.1. Verzeichnis der Abkürzungen

Für die Dünnschichtchromatographie wurden folgende Laufmittel verwendet:

(A) Butanol/Eisessig/Wasser (3:1:1)
(B) Chloroform/Methanol/Essigester/Eisessig (65:25:9:1)
(C) Chloroform/Methanol/Essigester (65:25:10)
(D) Butanol/Wasser/Pyridin/Eisessig (15:12:10:3)
(E) Methylenchlorid/Methanol (9:1)
(F) Methylenchlorid/Methanol (3:1)
(G) Methylenchlorid/Methanol/Eisessig (65:10:2)

Für die Elektrophorese dienten folgende Pufferlösungen:

(H) Collidin-Acetat pH 6.9 (0.067 M Collidin/0.054 M AcOH)
(I) Pyridin-Acetat pH 3.7 (0.04 M Pyridin/0.058 M AcOH)

AcOH	Essigsäure
Ac_2O	Acetanhydrid
AS	Aminosäure
ASA	Aminosäureanalyse
CD	Circulardichroismus
CT	Chlor-Tolidin-Test
DC	Dünnschichtchromatographie
DCCI	Dicyclohexylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography

KD	Kupplungsdauer
MeOH	Methanol
MM	Molmasse
MS	Massenspektrometrie
min	Minuten
NMM	N-Methylmorpholin
POE	Polyoxyethylen
PS	Polystyrol
RT	Raumtemperatur
Std	Stunden
TFA	Trifluoressigsäure
UT	Umsatztest

Die Abkürzungen der Aminosäuren und Schutzgruppen entsprechen den Empfehlungen der IUPAC-IUB-Kommission (124,125).

1.2. Geräte und Instrumente

- Mikrodosimat mit pH-Meter E 512 und Impulsomat E473 der Firma Methrom, Schweiz
- Schmelzpunktbestimmungsapparatur nach D. Tottoli der Firma Büchi, Schweiz
- Aminosäureanalysator Biotronik LC 6000 E
- Polarimeter Perkin-Elmer Modell 241
- IR-Spektrometer Perkin-Elmer Modell 281 B
- Gaschromatograph Carlo-Erba Modell 2101
- HPLC-Pumpen und -Prozessor Waters Assoc. Modell 660 mit UV-Einheit Kontron Uvikon 720 LC
- HPLC-Geräte Hewlett-Packard HP 1084 B mit variablen Wellenlängendetektor HP 79875 A und Dioden-Array-System 1040 A
- UV-Lampe UVIS von Desaga für 254/366 nm und Tageslichtvisualisation
- Quecksilberdampflampe Hanau Modell TQ 150 und TQ 150 Z2

- Fraktionssammler mit optischer Einheit ISCO UA 5 und ISCO 328
- Fraktionssammler LKB 7000 Ultrorac mit optischer Einheit Uvicord II und III
- Dünnschichtelektrophoreseapparatur der Firma Camag
- CD-Spektrometer Dichrographe II von Roussel Jouan, Paris
- Zeiss-Spektraphotometer PMQ II
- Visking Dialysierschlauch
- Massenspektrometer Varian MAT 711 A
- ^{13}C-NMR: Bruker WP 80
- ^{13}C-Relaxationszeiten: Bruker WH 90 mit Aspekt 2000 Datensystem
- ^{1}H-NMR: Bruker HFX 90

1.3. Lösungsmittel und Chemikalien

Methylenchlorid wurde über Kaliumcarbonat destilliert.
Diethylether wurde mit Natriumdispersion absolutiert und destilliert.
Dioxan wurde mit Natriumdispersion in Paraffin absolutiert und in N_2-Schutzgasatmosphäre destilliert.
DMF wurde eine Stunde mit Calciumhydrid gekocht, unter Lichtausschluß im Vakuum destilliert und nochmals in Gegenwart von Ninhydrin destilliert.
Essigsäure wurde mit P_4O_{10} getrocknet, abfiltriert und anschließend destilliert.
1.2 N HCl/AcOH wurde durch Einleiten von HCl-Gas in Essigsäure hergestellt; 1000 g AcOH enthielten 42 g HCl-Gas.
DMSO stammte von der Firma Merck, Darmstadt und wurde über Molekularsieb 4 Å aufbewahrt.
Polyoxyethylen stammte von den Chemischen Werken Hüls, Marl. Es wurde vor Gebrauch zweimal mit Ether aus Methylenchlorid umgefällt und im Hochvakuum getrocknet.

Polystyrol, 1 % vernetzt, 1.25 meq/g chlormethyliert stammte von der Firma Bio-Rad Laboratories, USA.
Die verwendeten Aminosäuren wurden von Ajinomoto CO. Inc. Tokyo, Japan bezogen.
DC-Platten KG 60 F_{254} sowie Cellulose-Platten zur Dünnschichtelektrophorese stammten von der Firma Merck, Darmstadt.

1.4. Nachweisreagentien

Anfärbereagentien für die Dünnschichtchromatographie:

Ninhydrinlösung (126,127)

Eine Mischung aus 200 ml n-Butanol, 6 ml Eisessig und 0.6 g Ninhydrin. Das Chromatogramm wird mit dieser Lösung besprüht. Bei 110°C ergeben freie und BOC-geschützte Aminogruppen nach 10 min eine rot-violette Färbung.

Chlor-Tolidin-Test (128,129)

80 mg o-Tolidin, 15 ml Eisessig und 0.5 g Kaliumjodid werden mit Wasser auf 250 ml aufgefüllt. Das getrocknete Chromatogramm wird mit Wasserdampf benetzt und mit elementarem Chlor 10 min lang chloriert. Überschüssiges Chlor wird von der Platte vertrieben und das Chromatogramm mit der Lösung besprüht. Blaue bis gelbe Flecken zeigen eine Peptidbindung an.

Dragendorff-Bürger-Reagens (130,131)

Lösung A: 1.7 g basisches Wismutnitrat werden in 20 ml AcOH gelöst. Nach Zusatz von 80 ml Wasser, einer Lösung von 40 g Kaliumjodid in 100 ml Wasser und 200 ml AcOH wird mit Wasser auf 1000 ml verdünnt.

Lösung B: 20 %ige Bariumchloridlösung

Vor Gebrauch wird eine Lösung von A und B im Verhältnis 2:1 hergestellt. Nach dem Besprühen zeigt das Chromatogramm bei Anwesenheit von Polyoxyethylen eine orange-rote Färbung.

Paulys Reagens (132,133)

Dies ist diazotierte Sulfanilsäure zum Nachweis für Phenole, kupplungsfähige Amine und Heterocyclen.

a) 4.5 g Sulfanilsäure werden in 45 ml 12 N HCl unter Erwärmen gelöst und die Lösung mit Wasser auf 500 ml verdünnt.
b) 4.5 %ige Natriumnitritlösung
c) 10 %ige Natriumcarbonatlösung

Gleiche Volumina von a) und b) werden kurz vor dem Besprühen der Platte gemischt. Das Chromatogramm wird besprüht, an der Luft getrocknet und dann mit Lösung c) besprüht. Die Bildung orange-roter Flecken gibt eine positive Reaktion an.

Zum Nachweis auf freie Aminogruppen am PS-POE-Träger diente folgender
Ninhydrintest (Umsatztest) (86)

1) 500 mg Ninhydrin in 10 ml Ethanol
2) 80 mg Phenol in 20 ml Ethanol
3) 2 ml 0.001 M Kaliumcyanidlösung in 100 ml Pyridin

2 mg des gut gewaschenen Polymerpeptids werden im gut verschlossenen Gläschen mit jeweils drei Tropfen von allen drei Reagentien 10 min auf 110°C erhitzt. Freie primäre Aminogruppen zeigen eine konzentrationsabhängige Blaufärbung von Lösung und Harz.

1.5. Allgemeine Arbeitsvorschriften

1.5.1. Aminosäureanalyse

Etwa 1 µMol Peptid wird in eine Glasampulle genau eingewogen, mit 4 ml 6 N HCl und einem Kristall Phenol versetzt und unter Luftausschluß eingeschmolzen. Dann wird 24 Std auf 110°C erhitzt. Beim Polymerpeptid wird ein Volumenanteil reine Propionsäure zugesetzt, 3 Std auf 140°C erhitzt und anschließend vom Polymer abfiltriert (134). In beiden Fällen wird die Lösung zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wird nach Spackman analyisert (135).

1.5.2. Razemisierungstest*

Die Prüfung auf Razemisierung erfolgt gaschromatographisch (120). Die Proben werden hierzu wie für die Aminosäureanalyse vorbereitet. Das trockene Hydrolysat wird in 0.5 ml 1.2 N HCl/Propanol aufgenommen und 1 Std bei 110°C verestert. Das Lösungsmittel wird mit Stickstoff abgeblasen. Die Acylierung der Aminosäuren wird mit 100 µl Pentafluorpropionsäureanhydrid in 0.5 ml Methylenchlorid während 10 min bei 110°C durchgeführt. Das Lösungsmittel wird mit Stickstoff abgeblasen. In einer mit Chirasil-Val beschichteten Glaskapillarsäule werden die flüchtigen Aminosäurederivate in ihre Enantiomere aufgetrennt und quantitativ erfaßt.

---

* Ich danke Herrn J. Gerhardt für die gaschromatographischen Messungen.

1.5.3. Aktivierung der Aminosäurederivate

10 mMol Aminosäurederivat werden in 20 ml Methylenchlorid gelöst und bei 0°C mit 2.5 ml 2 M DCCI/CH_2Cl_2-Lösung versetzt (Variante A). Bei einer Aktivesterkupplung mit HOBt werden entsprechend in 20 ml CH_2Cl_2/DMF (1:1) zusätzlich 15 mMol HOBt und 5 ml 2 M DCCI/CH_2Cl_2-Lösung dazugegeben (Variante B). Es wird 30 min bei 0°C und 30 min bei RT gerührt. Danach wird das aktivierte Derivat über eine Glasfritte G3 in die Reaktionslösung eingesaugt. Dabei wird der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff zurückgehalten.

1.5.4. Veresterung von PS-POE mit BOC-Glycin

BOC-Glycin wird entsprechend 1.5.3. Variante A voraktiviert. Pro meq Hydroxylgruppen am PS-POE werden 10 mMol BOC-Gly benötigt. Die Reaktionslösung wird unter Zugabe von etwas 4-Dimethylaminopyridin 2 Tage bei RT langsam geschüttelt. Danach wird die Zugabe von BOC-Gly in der gleichen Menge wiederholt. Nach weiteren 2 Tagen wird abgesaugt und der polymere Träger gut mit Methylenchlorid und Methanol gewaschen.

1.5.5. Photolyse

In einer Photolyseapparatur mit Tauchlampe, Glasfritte mit Zweiwegehahn und aufgesetztem Intensivkühler wird das Polymerpeptid in Methanol, DMF oder DMSO aufgeschlämmt und 1 Std mit Stickstoff gespült. Dann wird unter weiterem Durchleiten von N_2 mit einer Quecksilberdampflampe bei 25°C bestrahlt. Zur Kühlung der Lampe und um Wellenlängen unterhalb 330 nm auszufiltern wird 30 %ige Kupfersulfatlösung verwendet. Nach beendeter Reaktion wird durch eine Glasfritte filtriert und das Polymer gut ausgewaschen.

1.5.6. Schutzgruppenabspaltung mit HF*

Man gibt zu dem am Hochvakuum getrockneten Peptid 1 ml Anisol und kondensiert anschließend bei -30°C 10 ml Fluorwasserstoff ein. Es wird 30 min bei 0°C gerührt. Anschließend wird das Kältebad entfernt und das HF bei RT mit Stickstoff abgeblasen. Dann wird 4 Std im Hochvakuum über KOH stehengelassen. Das Produkt wird in Wasser gelöst, durch Extraktion mit Ether und Essigester gereinigt und lyophilisiert.

1.5.7. HPLC

Die Trennungen wurden durchweg an einer Säule Nucleosil C 18 (5 µm, 175 x 4.5 mm) vorgenommen. Zwei verschiedene Elutionssysteme kamen dabei zur Anwendung:

a) für geschützte Peptide:
   Gradient 75 % B ⟶ 100 % B in 15 min
   Lösungsmittel A: 0.05 M NH_4Ac-Puffer pH 3.0
   B: Methanol

b) für freie Peptide (117,118):
   Gradient 100 % A ⟶ 50 % B in 30 min
   Lösungsmittel A: 0.05 M NaH_2PO_4-Puffer pH 2.5
   B: Acetonitril

---

* Ich danke Herrn Dr. B. Hemmasi für die Durchführung der Reaktion.

2. Darstellung der Ausgangsverbindungen

2.1. Darstellung der Aminosäurederivate

BOC-Azid wurde nach der Methode von L. Carpino (136) hergestellt. Folgende BOC-Aminosäurederivate wurden nach der pH-Stat-Methode von E. Schnabel hergestellt (137):

BOC-Ala, BOC-Arg(Mbs)-OH, BOC-Arg(Tos)-OH, BOC-Asn, BOC-Gln, BOC-Glu(Bzl)-OH, BOC-Gly, BOC-Leu, BOC-Lys(O-BrZ)-OH, BOC-Phe, BOC-Pro, BOC-Ser(Bzl)-OH und BOC-Val.

Weiterhin wurden von den trifunktionellen Aminosäuren folgende Derivate hergestellt:

Z-Arg(Mbs)-OH (101), H-Arg(Tos)-OH (100), BOC-Cys(SiP)-OH (138), H-Glu(Bzl)-OH (94,139), BOC-Glu(Bzl)-ONP (140), BOC-His(BOC)-OH (141), H-Lys(O-BrZ)-OH (99), BOC-Thr(Bzl)-OH (92), BOC-Tyr(o-ClZ)-OH (54).

Außerdem wurde BOC-Ala-(4-carboxy-2-nitro)benzylester (53) hergestellt.

H-Ser(Bzl)-OH wurde käuflich von der Firma Fluka AG, Buchs erworben. Für die Überlassung des Tripeptidderivats BOC-Ser(Bzl)-His(Trt)-Leu-OH (52) danke ich Herrn Dr. W. Stüber. Alle eingesetzten Aminosäurederivate wurden einer dünnschichtchromatographischen Reinheitskontrolle unterzogen. Die Schmelzpunkte und Drehwerte der dargestellten Verbindungen stimmten, sofern nicht ausdrücklich vermerkt, mit den Literaturwerten überein.

2.2. BOC-Glu(Bzl)-Arg(Mbs)-OH

a) H-Arg(Mbs)-OH

23.9 g (50 mMol) Z-Arg(Mbs)-OH werden in 50 ml Essigsäure gelöst und nach Zugabe von 200 ml 33 %iger HBr/AcOH 45 min

bei RT gerührt. Die Lösung wird in einen Liter eiskalten Ether geschüttet. Das ausgefallene Produkt wird abgesaugt und mit Ether gewaschen. Man löst das Rohprodukt in 50 ml MeOH/AcOH (1:1) und kristallisiert das reine Produkt durch Eintropfen in einen Liter kalten, absoluten Ether aus. Man saugt ab, wäscht mit Ether und trocknet im Hochvakuum über P_4O_{10}.

Ausbeute: 15.7 g (91 % d.Th.) (Lit.: 48 %) (47)
Schmelzpunkt: 139-142°C (Lit.: 144-146°C)

Reinheitskontrolle: DC: R_F 0.24 (A)
Ninhydrin +
CT +

b) BOC-Glu(Bzl)-Arg(Mbs)-OH

7 g (20 mMol) H-Arg(Mbs)-OH werden in 100 ml DMF gelöst bei 0°C mit 10 g (22 mMol) BOC-Glu(Bzl)-ONP und 7 ml DIPEA versetzt. Dann wird 72 Std bei 0°C gerührt. Man verdünnt mit 120 ml Wasser und schüttelt mit Ether und Essigester solange aus, bis kein Nitrophenol mehr nachweisbar ist. Die wässrige Phase wird mit 2 N HCl auf pH 2.5 angesäuert und das Produkt mit Essigester ausgeschüttelt. Man wäscht mit Wasser neutral und trocknet über Natriumsulfat. Nach dem Einrotieren des Lösungsmittels trocknet man über P_4O_{10} im Hochvakuum. Das Produkt fällt als erstarrter, weißer Schaum an.

Ausbeute: 8.4 g (63 % d.Th.)

Reinheitskontrolle: DC: R_F 0.73 (A)
0.31 (C)

Drehwert: $[\alpha]_D^{21}$ = -2.7° (c = 1, MeOH)

Elementaranalyse:

$C_{30}H_{40}N_5O_9S$ (MM 646)

ber.:	55.7 C	6.2 H	10.5 N
gef.:	55.1 C	6.1 H	10.2 N

2.3. Veretherung von Polystyrol mit Polyoxyethylen

Zu einer 5 %igen Lösung von POE_{3000} in absolutem Dioxan wird unter N_2-Schutzgasatmosphäre Natriumhydrid, Natrium oder Kalium in äquimolaren Mengen bezogen auf die Hydroxylgruppen gegeben. Diese Mischung wird 4-6 Std gerührt. Dann wird weiterhin unter Schutzgas durch eine Glasfritte zu dem chlormethylierten Polystyrol filtriert, wobei ein dreifacher Überschuß an POE gegenüber Chlormethylgruppen vorliegen soll. Es wird weitere 72 Std gerührt, das Produkt abfiltriert und gut unter allmählicher Konzentrationsänderung mit Dioxan/Wasser und Wasser/Methanol gewaschen. Das so gereinigte Produkt wird im Hochvakuum bei 50°C getrocknet. Reaktionstemperatur und Beladungen siehe Abschnitt 5.2., Tabelle 1.

Tab. 4: Elementaranalysedaten der synthetisierten $PS\text{-}POE_{3000}$

Polymernummer	% C	% H	% Cl
6	69.41	8.96	1.04
7	71.70	8.72	1.39
8	72.01	9.35	0
9	72.72	10.67	0.22
10	70.09	9.32	0.18
11	69.25	9.51	0.54
12	69.18	9.28	0.32
13	70.73	9.53	0

2.3.1. Testkupplungen am polymeren Träger

5 g eines Trägergemisches aus den Synthesen Nr. 10, 11 und 12 (mittlere OH-Gruppenzahl: 0.085 meq/g Copolymer) werden entsprechend dem standardisierten Synthesezyklus (siehe Abschnitt 5.4.1.) mit Aminosäurederivaten umgesetzt. Die Aminosäurederivate werden in der Form ihrer Anhydride eingesetzt. Die Darstellung der Anhydride erfolgt nach 1.5.3. Beginnend mit BOC-Gly-POE_{3000}-PS wurden folgende Polymerpeptide hergestellt:

a) BOC-Phe-Gly-POE_{3000}-PS

gekuppeltes Aminosäurederivat: BOC-Phe
Kupplungsdauer: 120 min
Umsatztest: >99.4 %

Aminosäureanalyse:	Gly	Phe	
gefunden:	1	1.27	(vor Abspaltung der BOC-Gruppe)
	1	1.00	(nach Abspaltung der BOC-Gruppe)
theor.:	1	1	

b) BOC-Ala-Phe-Gly-POE_{3000}-PS

gekuppeltes Aminosäurederivat: BOC-Ala
Kupplungsdauer: 120 min
Umsatztest: >99.4 %

Aminosäureanalyse:	Gly	Phe	Ala
gefunden:	1	1.00	1.16
theor.:	1	1	1

c) BOC-Leu-Ala-Phe-Gly-POE_{3000}-PS

gekuppeltes Aminosäurederivat: BOC-Leu
Kupplungsdauer: 60 min
Umsatztest: >99.4 %

Aminosäureanalyse:	Gly	Phe	Ala	Leu
gefunden:	1	1.02	1.01	1.22
theor.:	1	1	1	1

3. Photolytische Abspaltung des Peptids B_{27-30} vom Träger PS-POE_{3000}

3.1. Aufarbeitung des geschützten Peptids

6.5 g Polymerpeptid werden nach 1.5.5. 22 Std in Methanol bestrahlt. Nach dem Einrotieren des Lösungsmittels werden 325 mg eines ockerfarbenen Produkts mit einem Peptidgehalt von 47 % erhalten. Es folgt eine Filtration über eine kurze Kieselgelsäule (KG 60 (0.2-0.063 mm), Säulendimension 25 x 5.4 cm). Als Lösungsmittel dient das Gemisch (B) der DC-Laufmittel. Durch anschließende Säulenchromatographie an KG 60 (Korngröße 0.063-0.04 mm, Säulendimension 80 x 2.3 cm) werden 115 mg Rohpeptid erhalten. Dieses wird in 15 ml Methanol gelöst und durch Gelchromatographie an Sephadex LH 20 mit Methanol als Elutionsmittel gereinigt (Säulendimension: 2.5 x 120 cm).
Die Detektion erfolgt mittels eines Durchflußphotometers bei 254 nm. Abbildung 11 zeigt das Elutionsdiagramm.

Die dabei erhaltenen Fraktionen lassen sich folgendermaßen charakterisieren:

Fraktion I : Peptidfraktion
Das Lösungsmittel wird abgezogen, das Produkt in Wasser suspendiert und lyophilisiert. Man erhält 52 mg Tetrapeptid, das ein weißes, voluminöses Aussehen hat. Abbildung 12 zeigt das HPLC des gereinigten Tetrapeptids.

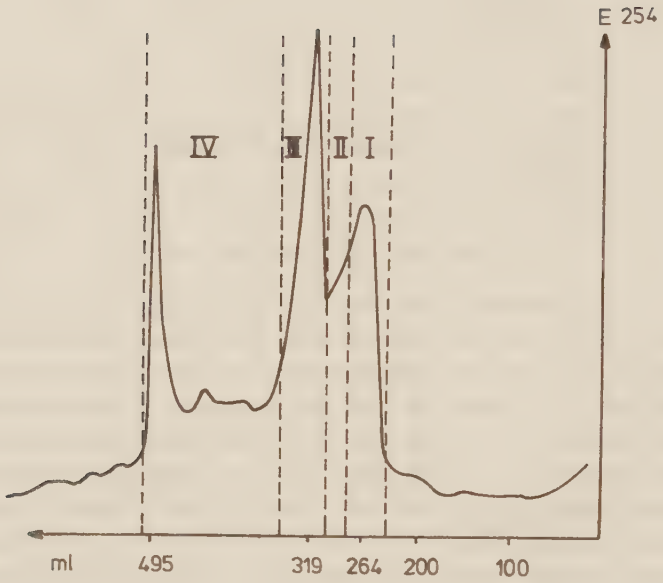


Abb. 11: Elutionsdiagramm des Tetrapeptids an Sephadex LH 20

Aminosäureanalyse:	Ala	Lys	Pro	Thr
gefunden:	1.00	1.08	1.05	1.02
theor.:	1	1	1	1

Reinheitskontrolle: DC: R_F 0.79 (A)
0.68 (B)
0.36 (C)

Drehwerte: $[\alpha]_D^{20}$ = -37.6° (c = 2, MeOH)

Elementaranalyse:

$C_{38}H_{52}O_{10}N_5Br$ (MM 819)	% C	% H	% N	% Br
gefunden:	54.8	6.5	8.2	8.9
ber.:	55.7	6.4	8.6	9.8

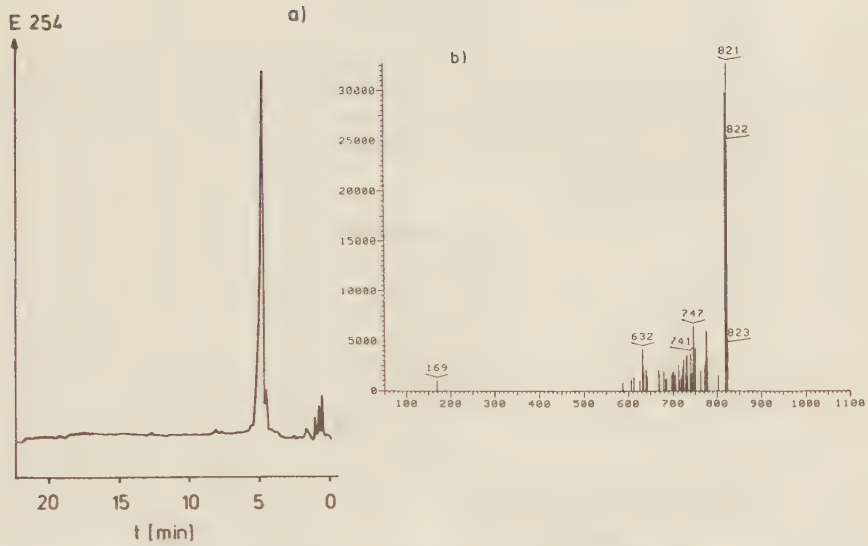


Abb. 12: a) HPLC-Spektrum und b) FD-MS-Spektrum des gereinigten geschützten Tetrapeptids.

Fraktion II und III: Rumpfsequenzen unterschiedlicher Aminosäurezusammensetzung

Fraktion IV: Enthält überwiegend Aromaten und Glycin.

3.2. Schutzgruppenabspaltung mit HF und Reinigung des Tetrapeptids

36 mg des geschützten Tetrapeptids werden nach 1.5.6. zur Reaktion gebracht. Das Lyophilisat wird in 0.01 M NH_4Ac-Lösung gelöst und über Ionenaustauschchromatographie an einer CM-Cellulose-Säule (Säulendimension 1.2 x 20 cm)

gereinigt. Die Gradientenelution wird mit 1 Liter 0.01 M Ammoniumacetatpuffer pH 4.5 begonnen und durch Zumischen von 1 Liter 0.2 M Ammoniumacetatpuffer pH 6.7 langsam gesteigert. Die zum Hauptpeak gehörenden Fraktionen (195-293 ml) werden isoliert und dreimal lyophilisiert. Man erhält 17 mg des weißen, amorphen Peptids. Dies entspricht einer Ausbeute von 21 % bezogen auf das eingesetzte BOC-Ala-Polymer.

Reinheitskontrolle: Dünnschichtelektrophorese
Es wird auf Celluloseplatten und mit Puffer (I) gearbeitet. Die Laufdauer beträgt 1 Std bei 400 V. Es ist nur ein scharf umrissener Fleck zu sehen.

R_F 0.81 bezogen auf Lysin

Ninhydrin +

Aminosäureanalyse:	Ala	Lys	Pro	Thr
gefunden:	1.00	1.03	1.02	0.98
theor.:	1	1	1	1

Razemisierungstest:

	D-Anteile in %			
	Ala	Lys	Pro	Thr
gefunden:	1.2	1.7	2.2	0.1
erw. Wert nach (123):	1.3	1.4	2.5	0.1

Elementaranalyse:

$C_{18}H_{32}N_5O_6$ x 2 CH_3COOH x H_2O (MM 552)

gef.:	48.43 C	7.73 H	12.31 N
ber.:	47.83 C	7.61 H	12.68 N

4. Synthese der Sequenz B_{1-30} des Rinderinsulins am immobilisierten Polyoxyethylen

Zunächst wird das Polymer entsprechend der Arbeitsvorschrift 1.5.4. mit BOC-Glycin verestert. Laut Aminosäureanalyse wurden dabei 44 g Polymer mit 3.65 mMol BOC-Glycin verestert. Zur Passivierung nicht umgesetzter Hydroxylgruppen wird anschließend 45 min mit 10 ml Acetanhydrid in 500 ml Methylenchlorid geschüttelt.

Die Synthese des Peptids beginnt mit der Einführung der C-terminalen Aminosäure-Ankerverbindung. Dieser erste Synthesezyklus sowie alle folgenden werden in einer Schüttelente nach Merrifield durchgeführt. Die einzelnen Arbeitsgänge, die bei jedem Zyklus erforderlich sind, werden analog der Tabelle in Abschnitt 5.4.1. ausgeführt. Bei jedem Arbeitsgang werden pro Gramm Polymerpeptid 7-8 ml Lösungsmittel benötigt.

Bei jeder Kupplung wird ein Umsatztest mit Ninhydrin (siehe 1.4.) durchgeführt. Nach jedem Syntheseschritt erfolgt eine Aminosäureanalyse.

Tabelle 4 gibt eine Übersicht über den Syntheseverlauf. Es werden die am Polymer dargestellte Insulinsequenz, die entsprechenden eingesetzten Aminosäurederivate, die Kupplungsdauer und die am Kupplungsende mit dem Ninhydrintest gefundenen Umsatzraten aufgelistet. Unter den Aminosäurederivaten ist in Klammern die jeweilige Variante der in 1.5.3. beschriebenen Aktivierung angegeben.

Die Aminosäureanalysen der jeweiligen Kupplungen sind in den Tabellen 5 und 6 zusammengefaßt.

Von dem polymeren Dekapeptid B_{21-30} werden 10 g der Reaktionsapparatur für eine Photolyse entnommen.

Tab. 4a: Syntheseverlauf der Kupplungen am Polymer bis zum Dekapeptid

Nr.	Sequenz	AS-Derivat (Kupplungsvariante)	KD [Std]	Kupplung lt UT [%]
1	B_{30}	BOC-Ala-OBzl(2-NO_2-4-COOH) (B)	20	> 99.4
2	B_{29-30}	BOC-Lys(o-BrZ)-OH (A)	3	> 99.4
3	B_{28-30}	BOC-Pro (A)	2	> 99.4
4	B_{27-30}	BOC-Thr(Bzl)-OH (A)	6	> 99.4
5	B_{26-30}	BOC-Tyr(o-ClZ)-OH (B)	17	> 99.4
6	B_{25-30}	BOC-Phe (A)	2	> 99.4
7	B_{24-30}	BOC-Phe (A)	2	> 99.4
8	B_{23-30}	BOC-Gly (A)	1	> 99.4
9	B_{22-30}	BOC-Arg(Mbs)-OH (A)	3	> 99.4
10	B_{21-30}	BOC-Glu(Bzl)-OH (A)	3	> 99.4

Tab. 4b: Syntheseverlauf der Kupplungen bis zur vollständigen Insulin-B-Kette

Nr.	Sequenz	gekuppeltes AS-Derivat (Kupplungsvariante)	KD [Std]	Kupplung lt UT [%]
11	B_{20-30}	BOC-Gly (A)	1	> 99.4
12	B_{19-30}	BOC-Cys(SiP)-OH (A)	2	> 99.4
13	B_{18-30}	BOC-Val (A)	2	> 99.4
14	B_{17-30}	BOC-Leu (A)	2	> 99.4
15	B_{16-30}	BOC-Tyr(o-ClZ)-OH (B)	3	= 99.4
16	B_{15-30}	BOC-Leu (A)	2	= 99.4
17	B_{14-30}	BOC-Ala (A)	4(1)	> 99.4
18	B_{13-30}	BOC-Glu(Bzl)-OH (A)	4(1)	> 99.4
19	B_{12-30}	BOC-Val (A)	4(1)	> 99.4
19a	B_{11-30}	BOC-Leu (A)	4(1)	= 99.4
19b	B_{10-30}	BOC-His(Trt)-OH (B)	4(1)	< 84
20	B_{9-30}	BOC-Ser(Bzl)-His(Trt)-Leu-OH (B)	16(1)	= 99.4
21	B_{8-30}	BOC-Gly (A)	4(1)	> 99.4
22	B_{7-30}	BOC-Cys(SiP)-OH (A)	6(1)	= 99.4
23	B_{6-30}	BOC-Leu (A)	6(1)	= 99.4
24	B_{5-30}	BOC-His(BOC)-OH (A)	6(1)	= 99.4
25	B_{4-30}	BOC-Gln (B)	6(1)	= 99.4
26	B_{3-30}	BOC-Asn (B)	4(1)	= 99.4
27	B_{2-30}	BOC-Val (A)	4(1)	= 99.4
28	B_{1-30}	BOC-Phe (A)	4(1)	= 99.4

Tab. 5: Ergebnisse der Aminosäureanalysen nach den Kupplungsschritten bis zum Dekapeptid. In Klammern sind die theoretischen Werte angegeben. Der Wert der zuletzt gekuppelten Aminosäure ist unterstrichen.

Nr.	Gly	Ala	Lys	Pro	Thr	Tyr	Phe	Arg	Glu
1	1.00 (1)	1.03 (1)							
2	1.00 (1)	1.00 (1)	1.02 (1)						
3	1.00 (1)	1.00 (1)	1.01 (1)	0.98 (1)					
4	1.00 (1)	1.00 (1)	1.02 (1)	0.92 (1)	0.89 (1)				
5	1.00 (1)	1.00 (1)	1.03 (1)	1.04 (1)	0.92 (1)	0.96 (1)			
6	1.00 (1)	1.00 (1)	1.01 (1)	0.90 (1)	0.85 (1)	0.96 (1)	0.85 (1)		
7	1.00 (1)	1.00 (1)	0.98 (1)	1.04 (1)	0.87 (1)	0.94 (1)	1.86 (2)		
8	1.93 (2)	1.00 (1)	0.96 (1)	0.90 (1)	0.92 (1)	0.94 (1)	1.83 (2)		
9	1.93 (2)	1.00 (1)	0.98 (1)	0.83 (1)	0.77 (1)	0.95 (1)	1.87 (2)	1.01 (1)	
10	1.91 (2)	1.00 (1)	1.02 (1)	1.02 (1)	0.79 (1)	0.94 (1)	1.82 (2)	0.88 (1)	0.98 (1)

Tab. 6: Ergebnisse der Aminosäureanalysen nach den einzelnen Kupplungsschritten beim Aufbau der vollständigen Insulin-B-Kette. In Klammern sind die theoretischen Werte angegeben. Die Werte der zuletzt gekuppelten Aminosäure sind unterstrichen.

Nr.	Gly	Ala	Lys	Pro	Thr	Tyr	Phe	Arg	Glu	Cys*	Val	Leu	His	Ser	Asp
11	3.10 (3)	1.00 (1)	1.02 (1)	1.00 (1)	0.85 (1)	0.98 (1)	1.87 (2)	0.95 (1)	1.00 (1)						
13	2.97 (3)	1.00 (1)	1.00 (1)	1.03 (1)	0.80 (1)	0.88 (1)	1.79 (2)	0.88 (1)	0.97 (1)	- (1)	0.87 (1)				
14	2.97 (3)	1.00 (1)	1.02 (1)	-* (1)	0.77 (1)	0.90 (1)	1.81 (2)	0.92 (1)	0.95 (1)	- (1)	0.86 (1)	0.86 (1)			
15	2.97 (3)	1.00 (1)	1.00 (1)	-* (1)	0.81 (1)	1.66 (2)	1.80 (2)	0.82 (1)	0.94 (1)	- (1)	1.31 (1)	0.84 (1)			
16	2.97 (3)	1.00 (1)	1.00 (1)	-* (1)	0.85 (1)	1.95 (2)	1.97 (2)	0.86 (1)	0.85 (1)	- (1)	0.92 (1)	1.86 (2)			
17	2.90 (3)	1.91 (2)	1.05 (1)	-* (1)	0.61 (1)	2.56 (2)	2.16 (2)	0.99 (1)	1.12 (1)	- (1)	0.97 (1)	2.03 (2)			
18	3.06 (3)	1.83 (2)	1.05 (1)	1.26 (1)	0.46 (1)	2.50 (2)	2.15 (2)	0.98 (1)	2.02 (2)	- (1)	0.97 (1)	2.02 (2)			
19	3.22 (3)	2.00 (2)	1.31 (1)	1.14 (1)	0.70 (1)	1.69 (2)	1.92 (2)	0.72 (1)	1.85 (2)	- (1)	1.80 (2)	1.41 (2)			
19b	3.24 (3)	2.00 (2)	1.10 (1)	-* (1)	0.80 (1)	1.87 (2)	2.05 (2)	1.04 (1)	1.88 (2)	- (1)	1.81 (2)	2.40 (3)	0.25 (1)		

Fortsetzung der Tabelle 6

Nr.	Gly	Ala	Lys	Pro	Thr	Tyr	Phe	Arg	Glu	Cys*	Val	Leu	His	Ser	Asp
20	2.86 (3)	1.97 (2)	1.05 (1)	-* (1)	0.75 (1)	1.81 (2)	1.97 (2)	0.95 (1)	1.73 (2)	- (1)	1.87 (2)	1.93 (3)	0.41 (1)	0.37 (1)	
21	3.38 (4)	1.85 (2)	1.05 (1)	-* (1)	0.77 (1)	1.61 (2)	1.98 (2)	0.96 (1)	1.76 (2)	- (1)	1.50 (2)	1.98 (3)	0.37 (1)	0.36 (1)	
23	3.45 (4)	1.92 (2)	1.05 (1)	-* (1)	0.92 (1)	1.66 (2)	1.90 (2)	0.94 (1)	1.78 (2)	- (2)	2.06 (2)	2.37 (4)	0.35 (1)	0.35 (1)	
24	3.23 (4)	2.21 (2)	1.05 (1)	-* (1)	0.78 (1)	1.82 (2)	2.14 (2)	1.01 (1)	1.80 (2)	- (2)	2.08 (2)	2.15 (4)	0.57 (2)	0.35 (1)	
25	3.66 (4)	2.36 (2)	1.00 (1)	0.95 (1)	0.80 (1)	2.04 (2)	2.35 (2)	1.15 (1)	2.36 (3)	- (2)	2.05 (2)	2.41 (4)	0.48 (2)	0.32 (1)	
26	3.80 (4)	1.38 (2)	1.05 (1)	0.87 (1)	0.85 (1)	1.78 (2)	2.06 (2)	0.95 (1)	2.04 (3)	- (2)	1.98 (2)	2.12 (4)	0.67 (2)	0.37 (1)	0.42 (1)
27	3.24 (4)	1.73 (2)	1.00 (1)	0.97 (1)	0.77 (1)	1.82 (2)	2.01 (2)	1.01 (1)	2.06 (3)	- (2)	2.43 (3)	2.08 (4)	0.69 (2)	0.25 (1)	0.24 (1)
28	3.18 (4)	1.78 (2)	1.00 (1)	0.98 (1)	0.72 (1)	1.82 (2)	2.69 (3)	1.01 (1)	2.07 (3)	- (2)	1.88 (3)	2.07 (4)	0.69 (2)	0.32 (1)	0.24 (1)

* wurde nicht analysiert

5. Kupplungen mit N^{ω}-Methoxybenzolsulfonylargininderivaten

5.1. Klassische Kupplungen

Die Umsetzungen erfolgen analog der Darstellung von Z-Arg(Tos)-Gly-OMe (144). Pro mMol Argininderivat werden je 1.25 mMol HOBt und Gly-OMe x HCl zusammen in einem THF/Methylenchlorid-Gemisch (2:1) gelöst und mit 0.15 ml DIPEA versetzt. Man kühlt auf -10°C und gibt langsam äquimolare Mengen einer DCCI/CH_2Cl_2-Lösung dazu. Es wird 16 Std bei 0°C und weitere 24 Std bei RT gerührt. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wird durch eine Glasfritte G3 abgetrennt, das Filtrat einrotiert und in wenig warmem Aceton gelöst. Man läßt die Lösung auf RT abkühlen und filtriert nochmals vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab. Das Lösungsmittel wird abrotiert, der Rückstand in Essigester gelöst und je dreimal mit 1 N HCl- und $NaHCO_3$-Lösung gewaschen. Anschließend wäscht man mit Wasser neutral, trocknet die organische Phase über Na_2SO_4 und zieht das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer ab.

5.1.1. Reaktion von Z-Arg(Mbs)-OH mit Gly-OMe

9.6 g (20 mMol) Z-Arg(Mbs)-OH werden nach der unter 5.1. angeführten Arbeitsvorschrift mit Gly-OMe gekuppelt. Nach dem Abdestillieren des Essigesters am Rotationsverdampfer wird ein gelbliches Öl erhalten. Das reine Dipeptid wird als weißes Produkt durch Kristallisation aus Aceton/Ether erhalten.

Ausbeute: 8.7 g (79 d.Th.)

Schmelzpunkt: 117-119°C

Reinheitskontrolle: DC: R_F 0.76 (A)
0.50 (G)

Ninhydrin -
CT +

Aminosäureanalyse:	Gly	Arg
gefunden:	1.00	0.98
theor.:	1	1

Drehwert: $[\alpha]_D^{25} = -3.8°$ (c = 3, MeOH)

Elementaranalyse:

$C_{24}H_{31}N_5O_8S$ (MM 550)

gef.:	52.81 C	5.27 H	12.23 N
ber.:	52.45 C	5.68 H	12.74 N

5.1.2. Reaktion von BOC-Arg(Mbs)-OH mit Gly-OMe

2.2 g (5 mMol) BOC-Arg(Mbs)-OH werden nach der unter 5.1. angeführten Vorschrift mit Gly-OMe umgesetzt. Nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels wird ein erstarrter gelber Schaum erhalten. Man löst in wenig Methanol und kühlt auf 4°C ab. Die dabei ausfallenden Kristalle werden abfiltriert. Man engt die Mutterlauge ein und kühlt erneut zur Kristallisation auf 4°C ab. Die auf diese Weise erhaltenen Kristalle werden durch Rekristallisation aus Aceton/Diisopropylether gereinigt. Man erhält 1.3 g einer weißen, kristallinen Substanz.

Abbildungen 13 und 14 zeigen das IR- und ^{13}C-NMR-Spektrum der isolierten Verbindung. Die Molmasse von 427 eines cyclischen Lactams wird durch FD-Massenspektrometrie bestätigt.

Reinheitskontrolle: DC: R_F 0.91 (A)
0.62 (G)

Schmelzpunkt: 185-187°C

Aminosäureanalyse:	Gly	Arg
	0	1

Elementaranalyse:

$C_{18}H_{26}N_4O_6S$ (MM 427)

gef.:	50.57 C	6.65 H	13.13 N	7.62 S
ber.:	50.58 C	6.01 H	13.11 N	7.49 S

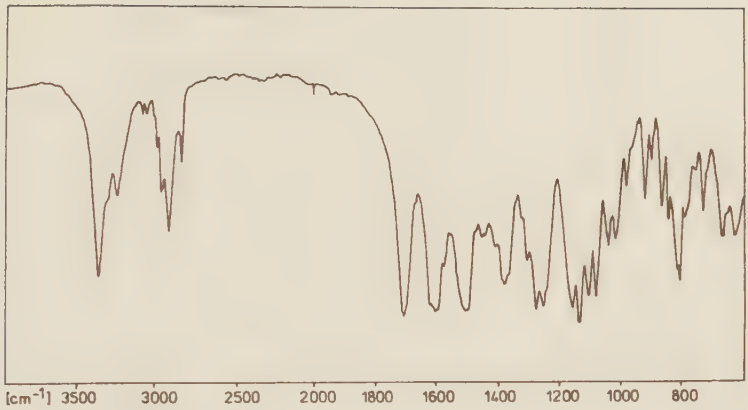


Abb. 13: IR-Spektrum der in 5.1.2. isolierten Verbindung

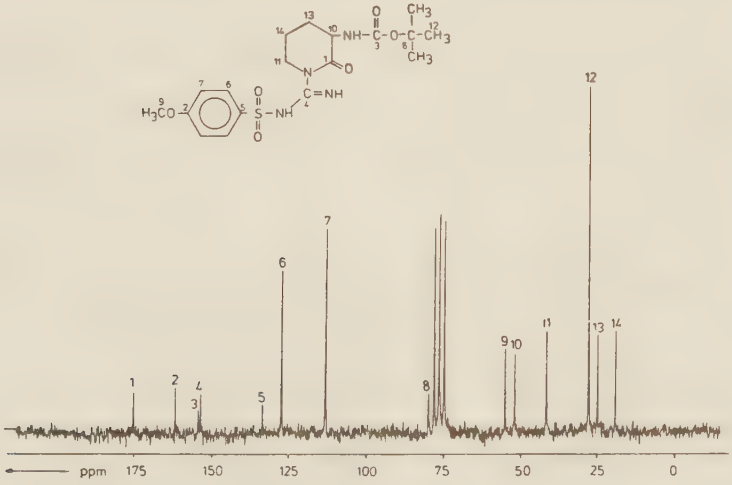


Abb. 14: ^{13}C-NMR-Spektrum der als cyclisches Lactam von BOC-Arg(Mbs) identifizierten Verbindung. Über den Signalen sind die Zuordnungen zu der dargestellten Struktur angegeben

Tab. 7: Kupplungsbedingungen und Aminosäureanalysedaten der Testkupplungen mit Arg(Mbs)-derivaten am polymeren Träger. In Klammern unter den Werten der Aminosäureanalyse sind die theoretischen Werte angegeben.

Nr.	Sequenz	AS-Derivat (Kupplungsvariante)	KD [Std]	UT [%]	Aminosäurezusammensetzung Gly	Ala	Lys	Pro	Thr	Tyr	Phe	Arg	Glu
1	B_{22-30}	BOC-Arg(Mbs)-OH (A)	2	< 84									
			4	= 90									
			6	= 94	2.05	1.00	1.00	0.97	0.95	0.95	1.75	2.98	
			10	= 94	2.04	1.00	1.00	0.88	0.98	0.94	1.87	4.21	
			12	= 94	1.98 (2)	1.00 (1)	1.00 (1)	0.81 (1)	0.88 (1)	0.97 (1)	1.87 (2)	4.39 (1)	
2	B_{21-30}	BOC-Glu(Bzl)-OH (A)	4	> 99.4	1.99 (2)	1.00 (1)	0.93 (1)	1.01 (1)	0.83 (1)	0.87 (1)	1.70 (2)	4.39 (1)	0.75 (1)
3	B_{21-30}	BOC-Glu(Bzl)-Arg(Mbs)-OH (B)	16	> 99.4	2.07 (2)	1.00 (1)	1.02 (1)	1.02 (1)	0.85 (1)	1.00 (1)	1.87 (2)	0.78 (1)	0.95 (1)
4	B_{22-30}	Z-Arg(Mbs)-OH (A)	3	> 99.4	2.00 (2)	1.00 (1)	1.04 (1)	0.92 (1)	0.97 (1)	1.04 (1)	1.93 (2)	0.99 (1)	

5.2. Testkupplungen von N^{ω}-Mbs-Argininderivaten am polymeren Träger

12 g Polymerpeptid auf der Oktapeptidstufe werden dem Synthesereaktor der in 4. beschriebenen Synthese entnommen und in drei Teile aufgeteilt. 6 g werden für den schrittweisen Aufbau des Dekapeptids mit BOC-Arg(Mbs)-OH und BOC-Glu(Bzl)-OH, 4 g für die Kupplung des Dipeptidderivats BOC-Glu(Bzl)-Arg(Mbs)-OH und 2 g für eine Reaktion mit Z-Arg(Mbs)-OH abgewogen. Die Kupplungen werden in verschiedenen Schüttelenten durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen und ausgeführten Arbeitsgänge entsprechen denen, die beim Aufbau der Insulinsequenz B_{1-30} in 4. beschrieben werden. Tabelle 7 gibt eine tabellarische Übersicht über die Syntheseverläufe. In Klammern unter den gekuppelten Aminosäurederivaten ist wieder die Variante der jeweiligen Aktivierung angegeben. Die Aminosäureanalysenwerte für Arginin sind zur Verdeutlichung der Verhältnisse eingerahmt.

Das durch schrittweise Kupplung erhaltene Dekapeptidpolymer wird in einer später beschriebenen Photolyse aufgearbeitet.

6. Photolytische Abspaltung von Peptiden am immobilisierten Polyoxyethylen

6.1. Isolierung des C-terminalen Dekapeptids $B_{21-30(T)}$

6.1.1. Photolytische Abspaltung und Reinigung des geschützten Dekapeptids

6 g des in 4. beschriebenen Dekapeptidpolymers werden analog Arbeitsvorschrift 1.5.5. in DMF als Lösungsmittel bestrahlt. Die Bestrahlungszeit beträgt 22 Std. Nach beendeter

Reaktion wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bei 0.05 Torr entfernt. Zurück bleiben 1014 mg eines bräunlichen Produkts mit einem Peptidgehalt von 44 %. Das entspricht einem Photolyseumsatz von 81 %.

Für die weiteren Reinigungsoperationen an Kieselgelsäulen wird als Elutionsmittel das in der DC eingesetzte Laufmittel (B) verwendet. Zunächst wird über eine kurze Kieselgelsäule (Korngröße 0.2-0.063 mm; Säulendimension 5.4 x 30 cm) von polymeren Bestandteilen abgetrennt. Fraktionen, die Peptid enthalten, werden gesammelt und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Zur Optimierung der Reinheit wird auf dieselbe Weise an einer weiteren Kieselgelsäule (Korngröße 0.063-0.04 mm; Säulendimension 2.3 x 80 cm) chromatographiert. Abbildung 15 zeigt das dabei erhaltene Elutionsdiagramm. Es wird am Durchflußphotometer bei 254 und 276 nm detektiert. Zusätzlich wird die Elution dünnschichtchromatographisch verfolgt. Stark verunreinigte Fraktionen werden verworfen. Die so erhaltenen Peptidfraktionen werden gesammelt und wie zuvor von Lösungsmitteln befreit.

Das erhaltene Produkt wird in 15 ml Methanol/Chloroform (2:1) gelöst und auf eine Sephadex LH 20-Säule aufgetragen (Säulendimension 2.5 x 120 cm). Als Elutionsmittel kommt Methanol zum Einsatz. Abbildung 16 zeigt das hierbei erhaltene Elutionsdiagramm. Die Fraktion, die im Diagramm am Schluß der Elution einen breiten Buckel verursacht, enthält laut Aminosäureanalyse kein Peptid. Diese Verunreinigung ist wahrscheinlich eine Folge des in der Photolyse verwendeten DMF.

Die erhaltene Peptidfraktion wird rechromatographiert, vom Lösungsmittel befreit und lyophilisiert. Man erhält 157 mg weißes, voluminöses Peptid. Dies entspricht einer Ausbeute von 29 % bezogen auf Polymerpeptid.

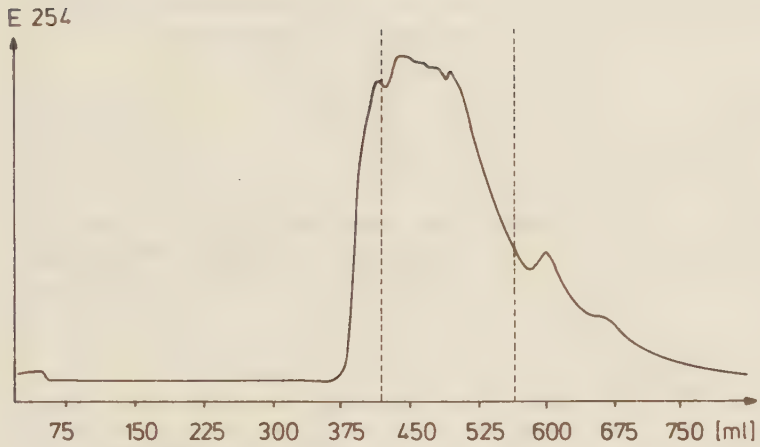


Abb. 15: Elutionsdiagramm der KG 60-Säulenchromatographie von $B_{21-30(T)}$. Die gestrichelte Linie gibt den Bereich der gesammelten Peptidfraktion an

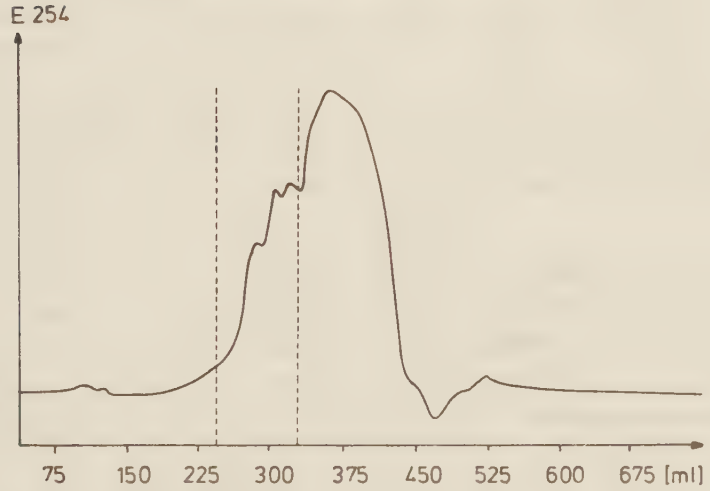


Abb. 16: Elutionsdiagramm der Säulenchromatographie an Sephadex LH 20

Reinheitkontrolle: DC: Es ist nur ein einziger Fleck zu sehen.

R_F 0.90 (A)
0.68 (B)

Ninhydrin +
CT +

HPLC: siehe Abbildung 17; das verwendete Trennsystem entspricht 1.5.7. (a)

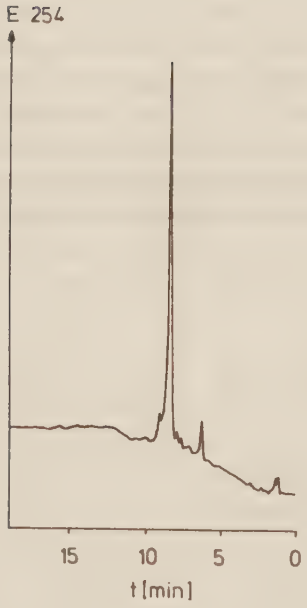


Abb. 17: HPLC des gereinigten, geschützten Dekapeptids

Aminosäureanalyse:

	Glu	Arg	Gly	Phe	Tyr	Thr	Pro	Lys	Ala
gef.:	1.10	1.06	1.01	2.01	1.03	0.96	0.95	1.02	1.00
theor.:	1	1	1	2	1	1	1	1	1

Razemisierungstest

	Glu	Arg	Gly	Phe	Tyr	Thr	Pro	Lys	Ala
gef.:	1.3	2.3	-	1.4	1.3	0.1	1.7	2.4	0.1
erw.Wert nach (123):	2.0	1.0	-	1.4	1.2	0.1	2.5	1.4	1.3

Drehwert: $[\alpha]_D^{21}$ = -18.5° (c = 1, DMF)

Elementaranalyse:

$C_{100}H_{119}N_{14}O_{23}SBrCl$ (MM 2032.5)

gef.:	58.33 C	5.72 H	9.04 N	1.94 S
ber.:	59.12 C	5.85 H	9.65 N	1.58 S

6.1.2. Schutzgruppenabspaltung mit HF und Reinigung des Dekapeptids

100 mg des geschützten, gereinigten Dekapeptids werden nach 1.5.6. zur Reaktion gebracht. Das Lyophilisat der HF-Reaktion wird durch Ionenaustauschchromatographie an einer CM-Cellulose-Säule (Säuledimension 1.2 x 20 cm) und einem Elutionsgradienten gereinigt. Begonnen wird mit einem Liter 0.01 M NH_4Ac-Lösung pH 4.5. Durch ständiges Zumischen von einem Liter 0.2 M NH_4Ac-Lösung pH 6.7 werden der pH-Wert und die Salzkonzentration langsam erhöht. In Abbildung 18 ist das Elutionsdiagramm dargestellt.

Die zum Hauptpeak gehörenden Fraktionen (292-360 ml) werden gesammelt und dreimal lyophilisiert. So erhält man 48 mg weißes, voluminöses Peptid. Das entspricht einer Ausbeute von 69 %, bzw. 21 % bezogen auf Polymerpeptid.

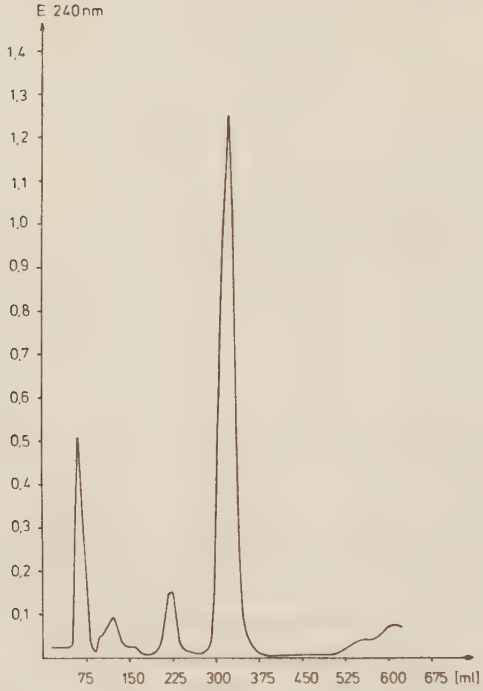


Abb. 18: Elutionsdiagramm der Ionenaustauschchromatographie des C-terminalen Dekapeptids

6.1.3. Reinheitskontrolle und physikalische Eigenschaften

Dünnschichtelektrophorese

Es kommen zwei Puffersysteme zum Einsatz. Zur Durchführung der Elektrophorese siehe 3.2.; die Bezeichnungen der Puffer entsprechen 1.1.

Puffer (I): Pyridin/Essigsäure pH 3.7
R_F 0.63 relativ zu Lysin

Puffer (II): Collidin/Essigsäure pH 6.3
R_F 0.56 relativ zu Lysin

In beiden Puffersystemen erhält man einen einzigen Fleck, der mit Ninhydrin, Paulys Reagens und im Sakaguchi-Test die entsprechenden positiven Färbungen zeigt.

DC

Es werden Cellulose-Fertigplatten verwendet.

R_F 0.56 (A)
0.63 (D)
Ninhydrin +
CT +
Sakaguchi +

HPLC

Siehe Abbildung 19; das zur Trennung verwendete System entspricht 1.5.7. (b).

Aminosäureanalyse

	Glu	Arg	Gly	Phe	Tyr	Thr	Pro	Lys	Ala
gef.:	1.10	0.96	1.01	1.97	0.96	0.98	0.98	1.00	1.00
theor.:	1	1	1	2	1	1	1	1	1

Razemisierungstest

	D-Anteile in %								
	Glu	Arg	Gly	Phe	Tyr	Thr	Pro	Lys	Ala
gef.:	1.6	2.0	-	0.9	1.0	0.1	1.7	1.7	1.2
erw. Wert nach (123):	2.0	1.0	-	1.4	1.2	0.1	2.5	1.4	1.3

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -48.4° (c = 1, AcOH)

Elementaranalyse

$C_{58}H_{83}N_{14}O_{15}$ (MM 1215 durch FAB-MS bestätigt)
x 2 CH_3COOH x 4 H_2O (MM 1407)

gef.: 53.52 C 6.76 H 13.42 N
ber.: 52.92 C 7.03 H 13.93 N

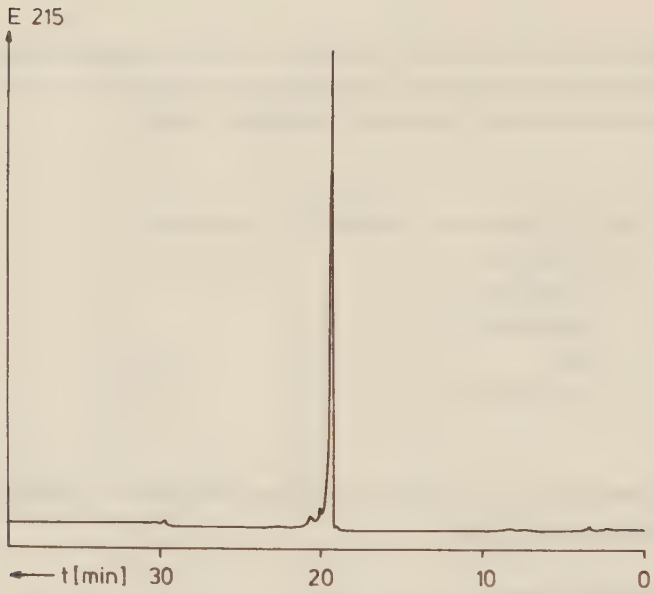


Abb. 19: HPLC des gereinigten C-terminalen Dekapeptids

6.2. Isolierung des C-terminalen Dekapeptids $B_{21-30(M)}$

6.2.1. Photolytische Abspaltung und Reinigung des geschützten Dekapeptids

6 g des in 5.2. schrittweise aufgebauten Dekapeptids werden analog 1.5.5. in MeOH als Lösungsmittel bestrahlt. Die Bestrahlungszeit beträgt 22 Std. Das Polymer wird abfiltriert und gut mit Chloroform ausgewaschen. Das Filtrat wird am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Man erhält 721 mg eines bräunlichen Produkts mit einem Peptidgehalt von 63 %. Das entspricht einem Photolyseumsatz von 86 %.

Die weiteren Reinigungsoperationen entsprechen den in 6.1.1. beschriebenen chromatographischen Trennungen an Kieselgelsäulen.

Das so erhaltene vorgereinigte Dekapeptid wird in 15 ml Methanol/DMF (2:1) gelöst und an Sephadex LH 20 (Säulendimension 2.5 x 120 cm) chromatographiert. Als Elutionsmittel kommt wieder Methanol zum Einsatz. Die Detektion erfolgt mittels Durchflußphotometer bei 254 nm. In Abbildung 20 ist das Elutionsdiagramm wiedergegeben.

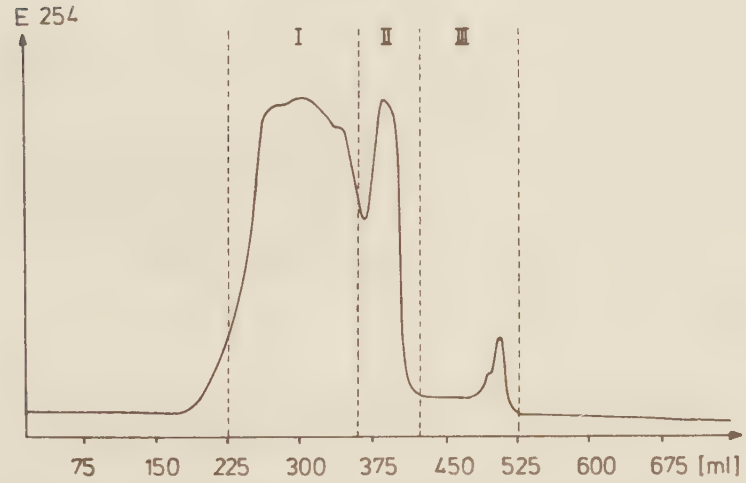


Abb. 20: Elutionsdiagramm der Gelchromatographie an Sephadex LH 20 von $B_{21-30(M)}$

Die hierbei erhaltenen Fraktionen lassen sich folgendermaßen zuordnen:

I = Peptidfraktion
II = DMF
III = aromatische Verbindungen, keine Aminosäuren.

Fraktion I wird gesammelt, vom Lösungsmittel am Rotationsverdampfer befreit und lyophilisiert. Man erhält 146 mg weißes, voluminöses Dekapeptid. Dies entspricht einer Ausbeute von 26 % bezogen auf eingesetztes Polymerpeptid.

Reinheitskontrollen: DC: R_F 0.89 (A)
0.64 (B)

Ninhydrin +
CT +

Es ist nur ein einziger Fleck zu sehen.

HPLC: siehe Abb. 21; das Trennsystem entspricht 1.5.7. (a).
Die hierbei detektierten Verunreinigungen konnten durch Chromatographie an Sephadex LH 20 nicht entfernt werden.

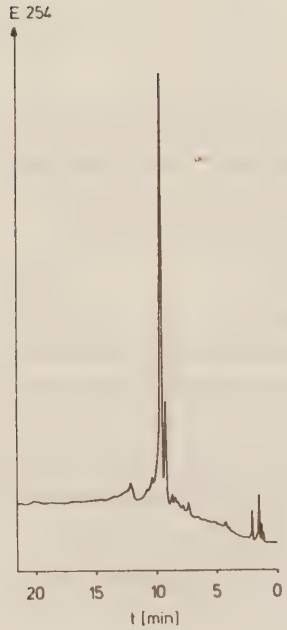


Abb. 21: HPLC des gereinigten Dekapeptids $B_{21-30(M)}$

Aminosäureanalyse:

	Glu	Arg	Gly	Phe	Tyr	Thr	Pro	Lys	Ala
gef.:	0.98	1.07	0.97	1.91	0.98	0.89	0.95	1.01	1.00
theor.:	1	1	1	2	1	1	1	1	1

Razemisierungstest:

	D-Anteile in %								
	Glu	Arg	Gly	Phe	Tyr	Thr	Pro	Lys	Ala
gef.:	2.1	1.4	-	1.8	1.7	0.1	2.4	2.8	2.1
erw.Wert nach (123):	2.0	1.0	-	1.4	1.2	0.1	2.5	1.4	1.3

Drehwert: $[\alpha]_D^{22} = -18.6°$ (c = 1, DMF)

Elementaranalyse:

$C_{100}H_{119}N_{14}O_{24}SBrCl$ (MM 2048.5)

gef.:	57.30 C	5.63 H	8.85 N	2.33 S
ber.:	58.66 C	5.81 H	9.58 N	1.57 S

6.2.2. Schutzgruppenabspaltung mit HF und Reinigung des Dekapeptids

106 mg des getrockneten, geschützten Dekapeptids werden nach 1.5.6. mit Fluorwasserstoff behandelt.

Die Reinigung des Lyophilisats mittels Ionenaustauschchromatographie erfolgt wie in 6.1.2. beschrieben. Abbildung 22 zeigt das erhaltene Elutionsdiagramm. Die zum Hauptpeak gehörenden Fraktionen werden gesammelt und dreimal lyophilisiert. Man erhält 53 mg weißes, voluminöses Peptid. Dies entspricht einer Ausbeute von 72 %, bzw. 20 % bezogen auf Polymerpeptid.

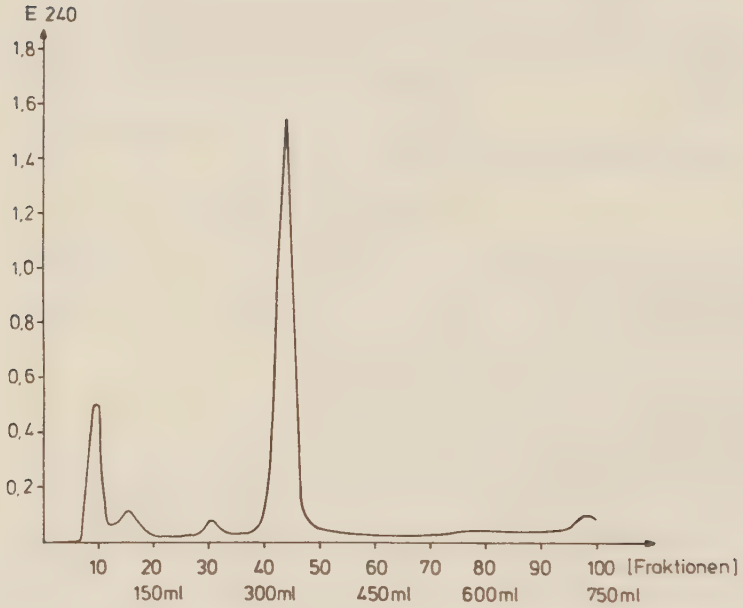


Abb. 22: Elutionsdiagramm der Ionenaustauschchromatographie des freien Dekapeptids

6.2.3. Reinheitskontrollen und physikalische Eigenschaften

Dünnschichtelektrophorese

Durchführung und Puffersysteme entsprechen 6.1.3.

Puffer (H): Collidin/Essigsäure pH 6.9
R_F 0.56 relativ zu Lysin

Puffer (I): Pyridin/Essigsäure pH 3.7
R_F 0.61 relativ zu Lysin

In beiden Puffersystemen erhält man mit den üblichen Anfärbereagenzien nur einen einzigen, scharf umrissenen Fleck.

DC

Es werden Cellulose-Fertigplatten verwendet.

R_F 0.50 (A)
0.62 (D)

Ninhydrin +
CT +
Sakaguchi +

HPLC

Es wird das in 1.5.7. beschriebene Trennsystem verwendet. Das Chromatogramm ist in allen Details identisch mit dem in 6.1.3., Abb. 19 wiedergegebenen.

Aminosäureanalyse

	Glu	Arg	Gly	Phe	Tyr	Thr	Pro	Lys	Ala
gef.:	1.05	1.02	1.00	2.01	0.99	0.96	1.01	0.98	1.00
theor.:	1	1	1	2	1	1	1	1	1

Razemisierungstest

	D-Anteile in %								
	Glu	Arg	Gly	Phe	Tyr	Thr	Pro	Lys	Ala
gef.:	0.8	2.1	-	1.0	0.9	0.1	2.0	1.1	0.5
erw.Wert nach (123):	2.0	1.0	-	1.4	1.2	0.1	2.5	1.4	1.3

Drehwert

$[\alpha]_D^{20} = -48.8°$ (c = 1, AcOH)

Elementaranalyse

$C_{58}H_{83}N_{14}O_{15}$ x 2 CH_3COOH x 4 H_2O (MM 1407)

gef.: 51.99 C 6.69 H 13.29 N
ber.: 52.92 C 7.03 H 13.93 N

6.3. Aufarbeitung der Rinderinsulinsequenz B_{1-30}

6.3.1. Photolytische Abspaltung

7.8 g des in 4. beschriebenen Polymerpeptids werden analog 1.5.5. in DMSO als Lösungsmittel bestrahlt. Die Bestrahlungszeit beträgt 24 Std.

Nach beendeter Reaktion wird das Polymer abfiltriert und gut mit DMSO gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden durch Destillation bei 0.01 Torr und einer Badtemperatur von 35°C weitestgehend vom Lösungsmittel befreit. Durch mehrmaliges Lyophilisieren erhält man 638 mg einer bräunlichen, festen Substanz mit einem Peptidgehalt von 79 %. Das entspricht einem Photolyseumsatz von 57 %.

Aminosäureanalyse:

	Gly	Ala	Lys	Pro	Thr	Tyr	Phe	Arg
gef.:	2.40	1.66	1.00	0.88	1.18	1.82	2.53	0.95
theor.:	3	2	1	1	1	2	3	1

	Glu	Cys	Val	Leu	His	Ser	Asp
gef.:	1.98	-	1.67	1.99	0.28	0.19	0.13
theor.:	3	2	3	4	2	1	1

Auf eine Reinigung des geschützten Peptids muß aufgrund der geringen Löslichkeit in anderen Lösungsmitteln als DMSO verzichtet werden.

6.3.2. Schutzgruppenabspaltung mit HF

600 mg des isolierten Peptids werden analog 1.5.5. bei 0°C 45 min mit HF behandelt. Das dabei erhaltene Öl wird in 50 ml Wasser aufgenommen. Die wässrige Phase wird drei-

mal mit Essigester und dreimal mit Chloroform extrahiert. Die organischen Phasen werden je einmal mit Wasser zurückextrahiert, die vereinigten wässrigen Phasen von unlöslichen Teilen durch Filtration befreit und lyophilisiert. Man erhält 120 mg eines bräunlichen, voluminösen Produkts mit einem Peptidgehalt von 35 %. Der relative Anteil der Insulin-B-Kette im Produktgemisch wird dem prozentualen Asparaginanteil gleichgesetzt. Somit beläuft sich die Ausbeute der Insulin-B-Kette auf 2 % bezogen auf das in die Photolyse eingebrachte Polymerpeptid.

Aminosäureanalyse:

	Gly	Ala	Lys	Pro	Thr	Tyr	Phe	Arg
gef.:	1.84	1.40	1.00	0.75	1.01	1.28	2.99	0.74
theor.:	3	2	1	1	1	2	3	1

	Glu	Cys	Val	Leu	His	Ser	Asp
gef.:	1.24	-	0.90	1.39	0.26	0.20	0.25
theor.:	3	2	3	4	2	1	1

6.3.3. Oxidative Sulfitolyse

115 mg des nach der HF-Reaktion erhaltenen Produkts werden in 60 ml Phosphat-Harnstoff-Puffer pH 7.5 (0.1 M NaH_2PO_4, 0.1 M Na_2HPO_4, 8 M Harnstoff) aufgenommen. 1.4 g Na_2SO_3 und 1.4 g $Na_2S_4O_6$ werden in drei Portionen während 30 min zugegeben. Dann wird noch 18 Std bei RT gerührt. Die resultierende klare Lösung wird 6 Std gegen zwei Liter Wasser bei stündlichem Wasserwechsel dialysiert. Man lyophilisiert und erhält 83 mg eines gelblichen, voluminösen Produkts. Der prozentuale Anteil an Insulin-B-Kette beträgt 4 %, das entspricht einer Ausbeute von 1.5 % bezogen auf Polymerpeptid. Rechnungsgrundlage ist, wie in 6.3.2. erläutert, der Asparaginwert.

Aminosäureanalyse:

	Gly	Ala	Lys	Pro	Thr	Tyr	Phe	Arg
gef.:	3.20	1.33	1.00	0.78	0.43	1.50	2.15	0.78
theor.:	3	2	1	1	1	2	3	1

	Glu	Val	Cys	Leu	His	Ser	Asp
gef.:	2.01	1.61	-	1.92	0.35	0.28	0.19
theor.:	3	3	2	4	2	1	1

Razemisierungstest:

	D-Anteile in %							
	Gly	Ala	Lys	Pro	Thr	Tyr	Phe	Arg
gef.:	-	3.0	2.7	2.9	7.6	1.7	1.8	3.3
erw.Wert nach (123):	-	1.3	1.4	2.5	0.1	1.2	1.4	1.0

	Glu	Val	Cys	Leu	His	Ser	Asp
gef.:	3.4	1.6	*	3.9	*	15.6	8.2
erw.Wert nach (123):	2.0	0.4	3.8	1.5	1.5	0.1	4.2

* = wurde nicht bestimmt.

C. ZUSAMMENFASSUNG

Es werden Synthesen von Insulinsegmenten am immobilisierten Polyoxyethylen unter Verwendung eines photolabilen Ankers beschrieben.

Dabei wurden zunächst Untersuchungen zur Darstellbarkeit der Trägerpolymere durch Veretherung von Polyoxyethylen und Polystyrol durchgeführt. Insbesondere wurde auf die Stabilität der erhaltenen Produkte und ihre Eigenschaften in einer standardisierten Peptidsynthese eingegangen. Dabei wurde eine durch Oxidationsanfälligkeit hervorgerufene Instabilität der Polymere beobachtet, die allerdings nur an der Luft auftrat. Aufgrund der geringen Zahl der funktionellen Gruppen, die nach der Veretherung zur Verfügung stand und der Eigenschaft, nicht kovalent gebundene Aminosäuren zu resorbieren, schien die Verwendung der Produkte in einer gezielten Synthese größerer Peptide nicht sinnvoll.

Die prinzipielle Möglichkeit einer photolabilen Abspaltung eines Peptids vom PS-POE wurde an der Isolierung und Charakterisierung des C-terminalen Tetrapeptids der Rinderinsulin-B-Kette sowohl in der geschützten als auch in der ungeschützten Form demonstriert.

Es wurde die Synthese des geschützten Dekapeptids Insulin B_{21-30} an einem PS-POE-Träger beschrieben, der durch Polymerisation von Ethylenoxid am modifizierten Polystyrol erhalten worden war. Besondere Aufmerksamkeit wurde dabei der Verwendung von Argininderivaten gewidmet, die an der Guanidinofunktion mit einer Methoxybenzolsulfonylgruppe geschützt sind. Es konnte gezeigt werden, daß aufgrund der Neigung zur Selbstkondensation des BOC-Arg(Mbs)-OH die Mbs-Schutzgruppe den Einsatz entsprechender Argininderivate in Peptidsynthesen am polymeren Träger proble-

matisch gestaltet. Es wurden daher in verschiedenen Kupplungen Dekapeptidpolymere synthetisiert, die entweder N^{ω}-Mbs-Arg oder N^{ω}-Tos-Arg enthielten. So konnte ein direkter Vergleich der entsprechenden Argininderivate gezogen werden.

Der Aufbau der vollständigen Insulin-B-Kette wurde im wesentlichen durch stufenweise Kupplungsreaktionen weitergeführt. Lediglich die Umsetzung zum Dokosapeptidpolymer erfolgte unter Verwendung eines entsprechenden Tripeptidderivats, da die Fragmentkondensation an dieser Stelle zu besseren Ergebnissen führte. Dennoch mußten bei den Reaktionen der letzten zehn Aminosäuren erhebliche Kupplungseinbußen in Kauf genommen werden.

Durch Photolyse in Methanol, DMF oder DMSO ließen sich die Peptide in geschützter Form in guten Ausbeuten abspalten. Eine Razemisierung wurde dabei nicht beobachtet. Durch chromatographische Reinigungsoperationen konnten die geschützten Dekapeptide in guter Reinheit erhalten werden. Eine Abspaltung der Schutzgruppen mit Fluorwasserstoff lieferte auch die freien Dekapeptide in reiner Form.

Eine Reinigung der geschützten B-Kette war aufgrund mangelhafter Löslichkeit nicht möglich. Die Abspaltung der Schutzgruppen durch Acidolyse mit Fluorwasserstoff und anschließender Sulfitolyse lieferte daher auch nur verunreinigtes Produkt mit sehr geringem Gehalt an Insulin-B-Kette. Auf eine Reinigung wurde deshalb verzichtet. Mit Hilfe der High Performance Liquid Chromatography und unter Anwendung der Photodioden-Array-Technik konnte jedoch das Vorhandensein synthetischer Insulin-B-Kette und die Identität mit natürlichem Peptid festgestellt werden. Für eine Wiederholung der Synthese sollte zunächst eine Stabilisierung der Bindung zwischen Peptid und Polymer erreicht werden. Desweiteren sollte große Aufmerksamkeit der quantitativen Kupplung der letzten zehn Aminosäuren und den dabei verwendeten Schutzgruppen gewidmet werden.

D. LITERATURVERZEICHNIS

1. E. Wünsch in Houben-Weyl: "Methoden in der organischen Chemie", Bd. XV/1 und 2, G. Thieme Verlag Stuttgart 1974
2. H.D. Jakubke und H. Jeschkeit, "Aminosäuren, Peptide, Proteine", Akademie-Verlag Berlin 1981
3. M. Bodanszky und M.A. Ondetti, Peptide Synthesis, Interscience Publishers New York 1966
4. E. Schröder und K. Lübke in "The Peptides", Vol. 1, Academic Press New York 1965
5. G. Barany und R.B. Merrifield, in "The Peptides", Vol. 2, Academic Press New York 1980
6. J.C. Sheehan und G.P. Hess, J. Amer. Chem. Soc. 77, 1067 (1955)
7. T. Curtius, Chem. Ber. 35, 3226 (1902)
8. R.A. Boissonas, Helv. Chim. Acta 34, 874 (1951)
9. T. Wieland, W. Kern und R. Sehring, Liebigs Ann. Chem. 569, 117 (1950)
10. M.A. Tilak, Tetrahedron 11, 849 (1970)
11. W. König und R. Geiger, Chem. Ber. 103, 788 (1970)
12. M. Bodanszky, Nature 175, 685 (1955)
13. G.W. Anderson et al., J. Amer. Chem. Soc. 85, 3039 (1963)
14. M. Bodanszky, M.A. Levine, S.D. Ondetti und N.J. Williams, J. Amer. Chem. Soc. 89, 6753 (1967)
15. E. Wünsch, Z. Naturforsch. 22b, 1269 (1967)
16. E. Wünsch, Naturwiss. 59, 239 (1972)
17. R.B. Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85, 2149 (1963)
18. R.B. Merrifield, J.M. Stewart und N. Jernberg, Anal. Chem. 38, 1905 (1966)
19. T.J. Lukas, M.B. Prystowsky und B.W. Erickson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 2791 (1981)
20. V.N.R. Pillai und M. Mutter, Top. Curr. Chem. 106, 119 (1982)

21. V.K. Sarin, S.B.H. Kent und R.B. Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 102, 5463 (1980)
22. E. Wünsch, Angew. Chem. 83, 773 (1971)
23. R.H. Andreatta und H. Rink, Helv. Chim. Acta 56, 1205 (1973)
24. E. Bayer, H. Eckstein, K. Hägele, W. König, W. Brüning, H. Hagenmaier und W. Parr, J. Amer. Chem. Soc. 92, 1736 (1970)
25. a) A. Marglin und R.B. Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 88, 5051 (1966)
b) Ch. Niu et al., Biopolymers 20, 1833 (1981)
26. S. Sano und M. Kurihara, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 1183 (1969)
27. J.J. Sharp et al., J. Amer. Chem. Soc. 95, 6097 (1973)
28. M. Izumiya et al., Proc. 4th Amer. Peptide Symp., Boston 1972, S. 269, Ann. Arbor Sciene Publ., Inc., Michigan
29. R.L. Colescott et al., Proc. 4th Amer. Peptide Symp., New York, S. 463, Ann Arbor Science Publ. Inc., Michigan
30. R.B. Merrifield, Pure Appl. Chem. 50, 643 (1979)
31. D.H. Rich und S.K. Gurwara, J. Amer. Chem. Soc. 97, 1575 (1975)
32. J.P. Tam, F.S. Tjoeng und R.B. Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 102, 6117 (1980)
33. F.S. Tjoeng und G.A. Heavner, Synthesis 1981, 897
34. M.M. Shemyakin, Y.A. Ovchinnikov, A.A. Kiryushkin und I.V. Kozhevnikova, Tetrahedron Lett. 27, 2323 (1965)
35. M. Mutter, H. Hagenmaier und E. Bayer, Angew. Chem. 83, 883 (1971)
36. E. Bayer und M. Mutter, Nature 237, 512 (1972)
37. M. Mutter und E. Bayer, Angew. Chem. 86, 101 (1974)
38. E. Bayer, M. Mutter, R. Uhmann, J. Polster und H. Mauser, J. Amer. Chem. Soc. 96, 7333 (1974)

39. V.N.R. Pillai, M. Mutter, E. Bayer und I. Gatfield, J. Org. Chem. 45, 5364 (1980)
40. F.S. Tjoeng, E.K. Tong und R.S. Hodges, J. Org. Chem. 43, 4190 (1978)
41. F.S. Tjoeng und G.A. Heavner, Tetrahedron Lett. 23, 4439 (1982)
42. H. Frank und H. Hagenmaier, Experientia 31, 131 (1975)
43. H. Frank, H. Meyer und H. Hagenmaier, Chemiker-Zeitung 101, 188 (1977)
44. H. Frank, H. Meyer und H. Hagenmaier, in "Peptides-Chemistry, Structure and Biology", Ann Arbor Science Publ. Michigan 1975, S. 439
45. G. Jung, G. Bovermann, W. Göhring und G. Heusel in "Peptides - Chemistry, Structure and Biology", Ann Arbor Science Publ., Michigan 1975, S. 433
46. G. Heusel, G. Bovermann, W. Göhring und G. Jung, Angew. Chem. 89, 681 (1977)
47. M. Schattenberg, Dissertation Universität Tübingen 1975
48. W. Stein, Dissertation Universität Tübingen 1976
49. R. Colombo und A. Pinelli, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 1385 (1981)
50. W. Woiwode, Dissertation Universität Tübingen 1977
51. R. Eberle, Dissertation Universität Tübingen 1979
52. W. Stüber, Dissertation Universität Tübingen 1983
53. B. Hemmasi, W. Stüber und E. Bayer, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 701 (1982)
54. B. Hemmasi, W. Woiwode und E. Bayer, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 1775 (1979)
55. W. Doll, Dissertation Universität Tübingen 1981
56. M. Dengler, Diplomarbeit Universität Tübingen 1981
57. F. Sanger, Biochem. J. 45, 563 (1949)
58. A.P. Ryle, F. Sanger, L.F. Smith und R. Kitai, Biochem. J. 60, 541 (1955)
59. J.S. Chan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 1964 (1976)

60. D.F. Steiner et al., Science 157, 697 (1967)
61. J. Meienhofer, E. Schnabel, H. Bremer, O. Brinkhoff, R. Zabel, W. Sroka, H. Klostermeyer, D. Brandenburg, T. Okuda und H. Zahn, Z. Naturforsch. 18b, 1120 (1963)
62. P.G. Katsoyannis, K. Fukuda, A. Tometsko, K. Suzuki und M. Tilak, J. Amer. Chem. Soc. 86, 930 (1964)
63. Y. Kung et al., Sci. Sin. 14, 1710 (1965)
64. K. Lübke und H. Klostermeyer, Adv. Enzymol. 33, 445 (1970)
65. Y.-C. Du et al., Sci. Sin. 10, 84 (1961)
66. P. Sieber, B. Kamber, A. Hartmann, A. Johl, B. Riniker und W. Rittel, Helv. Chim. Acta 57, 2617 (1974)
67. N. Yanaihara et al., in: T. Shiba (Hrsg.) (1978), "Peptide Chemistry 1977", Proc. 15th Symp. on Peptide Chemistry, Osaka 1977, Protein Research Foundation Osaka
68. J. Föhles et al., 15th Europ. Peptide Symp., Gdansk, Abstracts S. 65 (1978)
69. L. Villa-Kamaroff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 3727 (1978)
70. D.Y. Goeddel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 106 (1979)
71. U. Weber, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 1715 (1967)
72. U. Weber und M. Andre, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 701 (1975)
73. Ch. Voss und Ch. Birr, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 717 (1981)
74. S.L. Regen und L. Dulak, J. Amer. Chem. Soc. 99, 623 (1977)
75. A. Warshawsky, R. Kalir, A. Deshe, H. Berkovitz und A. Patchornik, J. Amer. Chem. Soc. 101, 4249 (1979)
76. H. Fujita, S.Yanagida und M. Okahara, Anal. Chem. 52, 869 (1980)
77. A. Warshawsky und B. Borer, Hydrometallurgy 4, 83 (1979)

78. G. Burgfels, Dissertation in Vorbereitung
79. H. Becker, H.-W. Lucas, J. Maul, V.N.R. Pillai, H. Anzinger und M. Mutter, Makromol. Chem., Rapid Commun. 3, 217 (1982)
80. M.A. Tilak und C.S. Hollinden, THL 1979, 3367
81. E. Bayer, E. Breitmaier, G. Jung und W. Parr, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 759 (1971)
82. J.T. Sparrow, J. Org. Chem. 41, 1350 (1976)
83. M. Mutter, Dissertation Universität Tübingen 1972
84. B.F. Gisin, Helv. Chim. Acta 56, 1476 (1973)
85. S. Yanagida H. Fujita und M. Okahara, Chem. Lett. 1981, 1617
86. E. Kaiser, R. Colescott, C.D. Bossinger und P.I. Cook, Anal. Biochem. 34, 595 (1970)
87. A. Patchornik, B. Amit und R.B. Woodward, J. Amer. Chem. Soc. 92, 6333 (1970)
88. V.N.R. Pillai, M. Mutter und E. Bayer, Tetrahedron Lett. 36, 3409 (1979)
89. W. Rapp, Dissertation in Vorbereitung
90. H. Hellstern, persönliche Mitteilung
91. U. Weber und P. Hartter, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 1384 (1970)
92. T. Mizoguchi, G. Levin, D.W. Woolley und J.M. Stewart, J. Org. Chem. 33, 903 (1968)
93. E. Wünsch und A. Zwick, Chem. Ber. 97, 2497 (1964)
94. S. Guttmann und R.A. Boissonas, Helv. Chim. Acta 41, 1852 (1958)
95. D. Yamashiro und C.H. Li, Int. J. Peptide Protein Res. 4, 181 (1972)
96. B.W. Erickson und R.B. Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 95, 3750 (1973)
97. D. Yamashiro und C.H. Li, J. Org. Chem. 38, 591 (1973)
98. A. Yavon und S.F. Schlossman, Biochemistry 7, 2673 (1968)
99. D. Yamashiro und C.H. Li, J. Amer. Chem. Soc. 95, 1310 (1973)

100. J. Ramachandran und C.H. Li, J. Org. Chem. 27, 4006 (1962)
101. O. Nishimura und M. Fujino, Chem. Pharm. Bull. 24, 1568 (1976)
102. G.C. Stelakatos, D.M. Theodropoulos und L. Zervas, J. Amer. Chem. Soc. 81, 2884 (1959)
103. G. Losse und U. Krychowski, J. Prakt. Chem. 312, 1097 (1970)
104. G. Losse, M. Mauck und H. Stange, Tetrahedron 33, 1813 (1977)
105. G. Losse, H. Stange, B. Schwenzer und W. Naumann, Tetrahedron 34, 2687 (1978)
106. G. Losse und K.-J. Schumacher, Tetrahedron 33, 1519 (1977)
107. H. Rink und B. Riniker, Helv. Chim. Acta 57, 831 (1974)
108. H.R. Bosshard, Helv. Chim. Acta 54, 951 (1971)
109. E. Breitmaier und W. Voelter, ^{13}C-NMR-Spectroscopy, Verlag Chemie, Weinheim 1974, S. 110 ff
110. R.S. Feinberg und R.B. Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 97, 3485 (1975)
111. G. Losse, B. Meisegeier, M. Mauck und H. Kleugel, Tetrahedron 33, 1993 (1977)
112. V.K. Naithani und J. Föhles, Hoppe-Selyer's Z. Physiol. Chem. 359, 1173 (1978)
113. K.B. Mathur, H. Klostermeyer und H. Zahn, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 346, 60 (1966)
114. J. Meienhofer, Liebigs Ann. Chem. 692, 231 (1964)
115. E. Schnabel, Liebigs Ann. Chem. 674, 218 (1964)
116. E. Schnabel, Z. Naturforsch. 19b, 120 (1964)
117. M.T.W. Hearn und B. Grego, J. Chromatography 203, 349 (1981)
118. J.H. Knox und G. Szókán, J. Chromatography 171, 439 (1979)

119. W. Stüber, B. Hemmasi und E. Bayer, Int. J. Peptide Protein Res. 22, 277 (1983)
120. H. Frank, G.J. Nicholson und E. Bayer, J. Chromatogr. Sci. 15, 174 (1977)
121. H. Frank, G.J. Nicholson und E. Bayer, J. Chromatography 167, 187 (1978)
122. W. Woidwode, H. Frank, G.J. Nicholson und E. Bayer, Chem. Ber. 111, 3711 (1978)
123. H. Frank, W. Woiwode, G.J. Nicholson und E. Bayer, Liebigs Ann. Chem. 1981, 354
124. Biochemistry 14, 449 (1972)
125. J. Biol. Chem. 247, 977 (1972)
126. D.J. Caldin, Chem. Rev. 60, 39 (1960)
127. R.A. Fahmy, A. Niederwieser, G. Pataki und M. Brenner, Helv. Chim. Acta 44, 2022 (1961)
128. F. Reindel und W. Hoppe, Chem. Ber. 87, 1103 (1954)
129. G. Pataki, J. Chromatogr. Sci. 12, 541 (1963)
130. K. Bürger, Z. Anal. Chem. 196, 251 (1963)
131. K. Bürger, Z. Anal. Chem. 224, 421 (1967)
132. H. Jatzkewitz, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 292, 99 (1953)
133. M.R. Grimmett, E.L. Richards, J. Chromatography 20, 171 (1965)
134. J. Scotchler, R. Lozier und A.B. Robinson, J. Org. Chem. 35, 1351 (1970)
135. D.H. Spackman, W.H. Stein und S. Moore, Anal. Chem. 30, 1185 (1958)
136. L.A. Carpino, C.A. Giza und B.A. Carpino, J. Amer. Chem. Soc. 81, 955 (1959)
137. E. Schnabel, Liebigs Ann. Chem. 702, 188 (1967)
138. H. Kunzek et al., J. Prakt. Chem. 322, 186 (1980)
139. E. Schröder und E. Klieger, Liebigs Ann. Chem. 673, 196 (1963)
140. C.H. Li, B. Gorup, D. Chung und J. Ramachandran, J. Org. Chem. 28, 178 (1963)

141. D. Yamashiro, J. Blake und C.H. Li, J. Amer. Chem. Soc. 94, 2855 (1972)
142. S. Sakakibara, Y. Shimonishi, Y. Kishida, M. Okada und H. Sugihara, Bull. Chem. Soc. Japan 40, 2164 (1964)
143. S.A. George und A. Maute, Chromatographia 15, 419 (1982)
144. E. Schnabel, Liebigs Ann. Chem. 667, 176 (1963)
145. E. Bayer, B. Hemmasi, K. Albert, W. Rapp und M. Dengler, Proc. 8th Amer. Peptide Symp., Tucson 1983, im Druck
146. B.F.H. Drenth, R.T. Ghijsen und R.A. de Zeeuw, J. Chromatogr. 238, 113 (1982)
147. A.F. Fell, H.P. Scott, R. Gill und A.C. Moffat, J. Chromatogr. 273, 3 (1983)
148. M. Bodanszky und J. Martinez, Synthesis 1981, 333
149. W. Naumann und G. Losse, Z. Chem. 21, 209 (1981)
150. K. Morihara, T. Oka und H. Tsuzuki, Nature 280, 412 (1979)
151. H.-G. Gattner, W. Danho, R. Knorr, V.K. Naithani und H. Zahn, "Peptides 1980", ed. K. Brunfeldt, Scriptor Kopenhagen 1981, S. 372
152. A. Jonczyk, H.-G. Gattner, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 1591 (1981)

Meine akademischen Lehrer waren Frau Professor S. Kemmler-Sack sowie die Herren Professoren und Dozenten

E. Bayer, W. Braun, G. Gauglitz, F. Gönnenwein, G. Häfelinger, H.-P. Hagenmaier, M. Hanack, V. Hoffmann, G. Jung, H. Krüger, D. Krug, U. Kunze, E. Lindner, I.-P. Lorenz, H. Mauser, H. Oberhammer, D. Oelkrug, H. Pauschmann, G. Pausewang, A. Rieker, W. Rüdorff, W. Rundel, F.F. Seelig, H. Stegmann, J. Strähle, H. Suhr, W. Voelter, W. Zeil.

LEBENSLAUF

Name:	Michael Dengler
Geboren:	30. Juli 1954 in München
Familienstand:	verheiratet seit Juni 1977 mit Viola, geb. Hirth
Schulbildung:	1961 - 1965 Grundschule in Karlsruhe 1965 - 1973 Bismarck-Gymnasium Karlsruhe Juni 1973 Abitur
Wehrdienst:	Oktober 1973 - Dezember 1974
Studium:	Oktober 1974 - Mai 1981 Chemiestudium an der Universität Tübingen Oktober 1977 Vordiplom September 1980 Hauptdiplomprüfung Oktober 1980 - Mai 1981 Diplomarbeit bei Herrn Prof. Dr. Ernst Bayer: "Synthese des C-terminalen Tetrapeptids der Rinderinsulin-B-Kette am PS-PEG"
Diplom:	Mai 1981
Promotion:	Juni 1981 - Juli 1983 Durchführung der experimentellen Arbeiten am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Ernst Bayer: "Synthese von Segmenten des Rinderinsulins am immobilisierten Polyoxyethylen unter Verwendung eines photolabilen Ankers"